
Regulation der humanen Aurora-A Kinase und Identifikation potentieller Interaktionspartner

**Dissertation
zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
der Fakultät für Biologie der
Ludwig-Maximilians Universität München**

**vorgelegt von
Thomas Alexander Kufer**

Martinsried / München 2004

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe.

Ich habe weder anderweitig versucht, eine Dissertation oder Teile einer Dissertation einzureichen beziehungsweise einer Prüfungskommission vorzulegen, noch eine Doktorprüfung durchzuführen.

München, Januar 2004

Dissertation eingereicht : Januar 2004

Tag der mündlichen Prüfung : 6. April 2004

Gutachter

Erstgutachter : Prof. Dr. Erich A. Nigg

Zweitgutachter : Prof. Dr. Thomas Cremer

Die vorliegende Dissertation wurde von Herrn Prof. Dr. Erich A. Nigg am Max-Planck-Institut für Biochemie, Abteilung Zellbiologie in Martinsried bei München betreut.

Teile dieser Arbeit sind veröffentlicht in:

“Regulation of Aurora-A kinase on the mitotic spindle”

Kufer T.A., Nigg EA, Sillje HH;
Chromosoma. 2003; 112(4):159-163

“Human TPX2 is required for targeting Aurora-A kinase to the spindle”

Kufer T.A., H.H.Sillje, R.Korner, O.J.Gruss, P.Meraldi und E.A.Nigg
The Journal of Cell Biology. 2002; 158:617-623.

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGEN UND FACHBEGRIFFE	1
SUMMARY (ENGLISCHE ZUSAMMENFASSUNG)	2
ZUSAMMENFASSUNG.....	3
EINLEITUNG	6
ZELLTEILUNG UND ZELLZYKLUS	6
DIE M-PHASE	9
AUFBAU UND REGULATION DER MITOTISCHEN SPINDEL	11
CENTROSOMEN UND DER CENTROSOMEN-ZYKLUS	14
DIE FAMILIE DER AURORA PROTEIN-KINASEN	17
DIE AURORA-A PROTEIN-KINASE	24
AURORA-A ALS PROTO-ONKOGEN	32
ZIELSETZUNG DER ARBEIT.....	36
ERGEBNISSE	37
CHARAKTERISIERUNG DER HUMANEN AURORA-A KINASE	37
<i>Rekombinante Aurora-A Kinase aus Sf9 Zellen.....</i>	37
<i>Bakteriell exprimierte rekombinante Aurora-A Kinase</i>	40
<i>Intramolekulare Regulation von Aurora-A.....</i>	41
<i>Aktivierung der humanen Aurora-A Kinase.....</i>	43
<i>Aufreinigung eines Aurora-A spezifischen polyklonalen Antikörpers.....</i>	44
<i>Subzelluläre Lokalisation von Aurora-A.....</i>	46
<i>Phänotypanalyse über Depletion von Aurora-A durch RNAi</i>	48
<i>Zusammenfassung.....</i>	50
SUCHE NACH INTERAKTIONSPARTNERN VON AURORA-A.....	50
<i>Aurora-A Co-Immunpräzipitationen aus Zellextrakten</i>	51
<i>Identifikation von Aurora-A Interaktionspartnern über Bindung an rekombinantes Protein.....</i>	53
<i>Charakterisierung der potentiellen Aurora-A Bindungspartner.....</i>	55
Charakterisierung des Interaktionspartners KIAA1007.....	55
Klonierung und Sequenzanalyse der KIAA1007 cDNA	55
KIAA1007 Lokalisation in humanen Zellen	56
KIAA1007 Interaktions- und Phosphorylierungsstudien	57
Zusammenfassung.....	58
Charakterisierung des Interaktionspartners KIAA1741.....	58
Klonierung der KIAA1741 cDNA	58
Generierung eines spezifischen Antikörpers gegen KIAA1741	59
Interaktions- und Phosphorylierungsstudien mit KIAA1741	60
Subzelluläre Lokalisation von KIAA1741	64
Charakterisierung des RNAi Phänotyps von KIAA1741	66
Zusammenfassung.....	67
CHARAKTERISIERUNG DES INTERAKTIONSPARTNERS TPX2.....	68
<i>Analyse der Aurora-A / TPX2 Interaktion</i>	68
<i>Phosphorylierung von TPX2 durch Aurora-A</i>	72
<i>TPX2 und Aurora-A co-lokalisieren an der mitotischen Spindel.....</i>	74
<i>siRNA Phänotyp von TPX2</i>	77
<i>Die Lokalisation von Aurora-A ist abhängig von TPX2</i>	79
<i>Regulation der Kinaseaktivität von Aurora-A durch TPX2</i>	81
<i>Suche nach einem allgemeinen Aktivierungsmotiv für Aurora-A.....</i>	84
<i>Zusammenfassung</i>	85

DISKUSSION	86
REGULATION VON AURORA-A DURCH PHOSPHORYLIERUNG	86
PHÄNOTYP DER AURORA-A DEPLETION.....	88
METHODEN ZUR IDENTIFIKATION NEUER AURORA-A BINDUNGSPARTNER	90
KIAA1007 IST EIN POTENTIELLER BINDUNGSPARTNER VON AURORA-A.....	91
KIAA1741 IST EIN NEUER AURORA-A BINDUNGSPARTNER UND EIN SUBSTRAT.....	92
DIE WECHSELWIRKUNG VON AURORA-A UND TPX2.....	94
TPX2 IST EIN SUBSTRAT VON AURORA-A.....	100
TPX2 RNAi PHÄNOTYP ANALYSE	102
AURORA-A, TPX2 UND MALIGNEN ENTARTUNG.....	103
AUSBLICK.....	104
MATERIAL UND METHODEN.....	105
MATERIAL UND BEZUGSQUELLEN	105
<i>Escherichia coli</i> Stämme.....	105
Zelllinien und Hefestämme.....	105
Enzyme, Proteine und Nukleinsäuren, Aminosäuren.....	106
Oligonukleotide.....	106
Puffer und Lösungen.....	106
Sonstige Materialien.....	107
HANDHABUNG UND MODIFIKATION VON NUKLEINSÄUREN	107
Klonierungen	107
Verwendete Plasmide.....	109
ZELLBIOLOGISCHE UND BIOCHEMISCHE METHODEN	110
SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Immunblotting von Proteinen	110
Reinigung rekombinanter Proteine aus Sf9 Zellen	110
Reinigung rekombinante Proteine aus <i>E. coli</i>	111
Generierung spezifischer Antikörper.....	112
Zellextrakte	113
Immunpräzipitationen.....	114
Gelfiltration von Zellextrakten.....	114
In vitro Protein-Bindungsanalysen	115
“Fishing” Experimente.....	115
Kinaseassays, Aktivierungsassays, PP1 Behandlung	115
Phosphoaminosäurenanalyse	117
Massenspektrometrische Verfahren.....	117
Transfektion humaner Zellen	118
siRNA Experimente.....	118
Immunfluoreszenz- und Dekonvolutions-Mikroskopie	119
Zellzyklus-Analysen	120
Amplifikation der cDNA Bibliothek und Yeast Two Hybrid (Y2H) Screen	120
BIOINFORMATIK	121
DANKSAGUNG.....	122
VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN UND TABELLEN.....	123
LITERATURVERZEICHNIS	124
ANHANG I (CV)	139
ANHANG II (VERÖFFENTLICHUNGEN)	142

Abkürzungen und Fachbegriffe

Ak	Antikörper	KD	“Kinase dead” – inaktive Kinase
Amp	Ampicillin	MAP	Mikrotubuli assoziiertes Protein
AS	Aminosäure	MBP	Myelin basisches Protein oder Maltose-bindendes Protein
bp	Basenpaar(e)	MC	Microcystin-LR
CBB	Coomassie Brilliant Blue (BB)	min	Minute(n)
cDNA	reverses Transkript der Boten-Ribonukleinsäure	MOPS	3-[N-Morpholino]-Propan-Sulfonsäure
DAPI	4-6-diamidino-2-phenylindol	MT	Mikrotubuli
DIC	Differential-Interferenz-Kontrast	MTOC	Mikrotubulus-Organisationszentrum
DMSO	Dimethylsulfoxid	MGW	Molekulargewichtsmarker
DNA	Desoxyribonukleinsäure	nt	Nukleotid
DNase	Desoxyribonuklease	OA	Oxalacetic Acid
dATP (A)	Desoxyadenosintriphosphat	OD	Optische Dichte
dCTP (C)	Desoxycytidintriphosphat	OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
dGTP (G)	Desoxyguanosintriphosphat	ORF	Offener Leserahmen
dITP (I)	Desoxyinosintriphosphat	PCR	Polymerase Ketten Reaktion
dNTP (N)	Desoxynukleosidtriphosphat	PFA	Paraformaldehyd
dTTP (T)	Desoxythymidintriphosphat	Primer	Oligonukleotid für PCR Reaktionen
ds	doppelsträngig	RNA	Ribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	RNase	Ribonuklease
ER	endoplasmatisches Retikulum	SDS	Natriumdodecylsulfat
EGFP	modifiziertes, grün-fluoreszierendes Protein	TE	Tris-HCl/EDTA
GST	Glutathion-S-Transferase	Tris	Trishydroxymethylaminomethan
GTP	Guanosintriphosphat	Tub	Tubulin
h	Stunde(n)	U	Unit (Enzymaktivitätseinheit)
IgG HC	Immunglobulin G, schwere Kette	Upm	Umdrehungen pro Minute
IP	Immunpräzipitation	WT	Wildtyp
kb	Kilo Basenpaare	Y2H	Yeast Two Hybrid

Nicht aufgeführte Abkürzungen entsprechen der IUPAC-Konvention.

Summary (englische Zusammenfassung)

The error-free segregation of duplicated chromosomes during cell division is essential for the maintenance of an intact genome. This process is brought about by a highly dynamic bipolar array of microtubules, the mitotic spindle. Prominent amongst the regulators of the mitotic spindle is the serine/threonine-specific protein kinase Aurora-A. However, only a few interaction partners and physiological substrates of Aurora-A are known to date and the function of this important kinase is only beginning to emerge.

To gain further insight in the cellular function of Aurora-A I set out studies to characterize Aurora-A and to identify new interaction partners of Aurora-A. To characterize the cellular function of Aurora-A the siRNA phenotype of Aurora-A was analysed. This showed that Aurora-A depletion in human HeLa cells led to apoptosis and spindle defects. To identify new Aurora-A interacting proteins a polyclonal antibody against Aurora-A was generated and used in co-immunoprecipitations from cell extracts. In addition Yeast-Two-Hybrid Screening and fishing experiments with recombinant proteins were performed. These studies provided four new putative Aurora-A interacting partners (KIAA1007, KIAA1741, TPX2 and a candidate from the Yeast-Two-Hybrid Screen). The interaction of these proteins with Aurora-A was verified using different biochemical methods. KIAA1741 and TPX2 were analysed in more detail. A polyclonal antibody against KIAA1741 was generated and KIAA1741 was shown to localize to actin rich structures within the cell. KIAA1741 interacted with recombinant Aurora-A showing a higher affinity for the catalytically active kinase in mitosis. Depletion of KIAA1741 by siRNA induced a G₁ arrest. Interestingly KIAA1741 was a good *in vitro* substrate of Aurora-A.

Most importantly this study revealed that Aurora-A binds to TPX2, a known component of the spindle apparatus. Binding studies demonstrated that the first 43 amino acids of TPX2 were sufficient and necessary for the interaction with the C-terminal catalytic domain of Aurora-A. Although kinase activity was not required for this interaction, TPX2 was readily phosphorylated by Aurora-A on serine residues. Upon siRNA-mediated elimination of TPX2 from cells, the association of Aurora-A with the spindle microtubules was abolished. Furthermore these experiments showed that TPX2 was essential for the formation of a bipolar spindle and spindle pole integrity.

Moreover I could demonstrate that TPX2 activates the Aurora-A kinase activity in a microtubule dependant manner, indicating that TPX2 is a new regulator of Aurora-A.

Zusammenfassung

Während der Zellteilung ist die exakte Segregation des genetischen Materials auf die beiden neu entstehenden Tochterzellen essentiell für das Überleben der Zellen. Dies wird in höheren Eukaryoten durch eine dynamische Anordnung von Mikrotubuli, die mitotische Spindel, vermittelt. In der Regulation des Ablaufes der Mitose und der mitotischen Spindel, spielt reversible Proteinphosphorylierung durch mitotische Proteinkinasen und Phosphatasen eine entscheidende Rolle. Ein wichtiger Regulator der mitotischen Spindel ist die Serin-Threonin Proteinkinase Aurora-A.

Kinasen der Aurora-A Familie zeigen ein komplexes Regulations- und Lokalisationsmuster in der Zelle, was auf vielfältige Funktionen in der Zelle schließen lässt. Wie Aurora-A auf molekularer Ebene reguliert wird und wie die Kinase ihre Funktionen in der Zelle ausübt, ist jedoch noch nicht im Detail verstanden. So ist auch die Anzahl der identifizierten Aurora-A Substrate und Interaktionspartner gering. Um die Funktion der humanen Aurora-A Kinase besser verstehen zu können, ist es notwendig, weitere Bindungspartner und *in vivo* Substrate zu identifizieren sowie Aurora-A auf molekularer Ebene näher zu charakterisieren.

Um Aurora-A zu charakterisieren, wurde rekombinante Aurora-A Kinase exprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass die rekombinante Kinase *in vitro* aktiv war und Serin- und Threoninreste in der katalytischen Domäne autophosphoryliert wurden. Durch die Herstellung eines spezifischen polyklonalen Antiserums gegen Aurora-A wurde das endogene Protein in humanen Zelllinien charakterisiert. Immunfluoreszenz-Analysen zeigten, dass Aurora-A in der G₂/M-Phase, nicht jedoch in der G₁- und S-Phase exprimiert wurde. Die Kinase lokalisierte in der G₂-Phase an die Centrosomen, wohingegen in der Mitose Aurora-A neben den Spindelpolen auch an den Spindel-Mikrotubuli nachgewiesen wurde. Durch siRNA wurde der Phänotyp der Depletion von Aurora-A in humanen HeLa S3 Zellen analysiert. Depletion von Aurora-A durch siRNA führte in erster Linie zu einer erhöhten Apoptose. Aurora-A Depletion interferierte nicht mit der Ausbildung einer bipolaren Spindel, es wurden jedoch breitere Spindelpole und leichte Mikrotubuli-Organisationsstörungen beobachtet.

In der vorliegenden Arbeit wurden ferner Substrate und Interaktionspartner der humanen Aurora-A Kinase identifiziert, validiert und näher auf molekularer Ebene charakterisiert. Mittels Yeast-Two-Hybrid (Y2H) Screening, *in vitro* Bindungsexperimenten und Co-Immunpräzipitationen konnten vier neue potentielle

Bindungspartner von Aurora-A (KIAA1007, KIAA1741, TPX2 und ein Kandidat aus dem Y2H Screen) isoliert werden. Zwei dieser Bindungspartner waren zudem *in vitro* Substrate der Kinase. Die Interaktionspartner KIAA1741 und TPX2 wurden biochemisch und zellbiologisch eingehender charakterisiert.

Gegen das hochmolekulare Protein KIAA1747 (182 kDa) wurde ein spezifisches polyklonales Antiserum erzeugt und die Lokalisation und Interaktion mit Aurora-A wurde analysiert. KIAA1741 zeigte eine Co-Lokalisation mit aktinreichen Strukturen und dem Zellkortex. Diese Lokalisation konnte durch Expression eines myc-KIAA1741-Fusionsproteins bestätigt werden. KIAA1741 war zellzyklusunabhängig exprimiert und zeigte eine Retardation der elektrophoretischen Mobilität in der M-Phase. Co-Immunpräzipitations Experimente bestätigten, dass KIAA1741 in der M-Phase mit endogener Aurora-A Kinase interagiert. Bindungsexperimente mit rekombinanter Aurora-A Kinase und Zellextrakten aus humanen HeLa S3 Zellen bestätigten diese Interaktion und zeigten zudem, dass KIAA1741 in der Mitose eine geringere Affinität für eine katalytisch inaktive Mutante (K162R) der Kinase zeigte. KIAA1714 wurde ferner von Aurora-A *in vitro* phosphoryliert und stellte das beste derzeit isolierte hochmolekulare Substrat von Aurora-A dar. Depletion von KIAA1741 über siRNA führte zu einem G₁-Arrest in HeLa S3 Zellen.

Als interessantester neuer Aurora-A Bindungspartner wurde TPX2 identifiziert. TPX2 ist ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein, welches über RanGTP und Importin α/β Bindung reguliert wird. TPX2 ist im Krallenfrosch *Xenopus laevis* essentiell für die Ausbildung der mitotischen Spindel. Durch Bindungsexperimente mit rekombinanten und *in vitro* translatierten Proteinen, konnte hier gezeigt werden, dass die katalytische Domäne von Aurora-A direkt mit dem Aminoterminus (AS 1-43) von TPX2 interagiert. Diese Bindung war unabhängig von der Aurora-A Kinaseaktivität. TPX2 war zudem ein Substrat und wurde *in vitro* von Aurora-A an Serinresten im Aminoterminus phosphoryliert. TPX2 und Aurora-A co-lokalisierten an den Spindel-Mikrotubuli *in vivo*. Durch siRNA von TPX2 beziehungsweise Aurora-A in humanen HeLa Zellen konnte gezeigt werden, dass die Lokalisation von Aurora-A an den Spindel-Mikrotubuli abhängig von TPX2 war, wohingegen TPX2 unabhängig von Aurora-A lokalisierte. Die Depletion von TPX2 in HeLa S3 Zellen führte zu einem Metaphase-Arrest mit starken Spindeldefekten sowie zur Fragmentierung der Spindelpole. Phosphorylierungs-Studien demonstrierten zudem, dass TPX2 *in vitro* als Aktivator der Aurora-A Kinaseaktivität fungierte. Mikrotubuli vermochten hierbei die Aktivierung der Kinaseaktivität von Aurora-A durch TPX2 weiter

signifikant zu steigern. Kinaseassays mit Fragmenten des humanen TPX2 Proteins zeigten, dass die aminoterminal Domäne von TPX2 (AS 1-43) notwendig und ausreichend für diese Aktivierung von Aurora-A war.

Mit TPX2 konnte somit erstmals ein wichtiger Regulator der humanen Aurora-A Kinase identifiziert und auf molekularer Ebene charakterisiert werden. Das TPX2 Protein ist notwendig für die Lokalisation und Aktivierung der humanen Aurora-A Kinase an die Spindel-Mikrotubuli und essentiell für die Bildung einer biploaren mitotischen Spindel in humanen Zellen.

Einleitung

Zellteilung und Zellzyklus

“omnis cellula e cellula“: Zellen entstehen durch Teilung bestehender Zellen. Diese wichtige Erkenntnis, vertreten von Rudolf Virchow (1821-1902) begründete 1855 die moderne Zelltheorie, die auf den Ideen von Theodor Schwann (1810-1882) und Mathias Schleiden (1804-1881) aufbaut. Seither sind Forscher bemüht, den elementaren Prozess allen Lebens – die Zellteilung – im Detail zu verstehen. Schon früh wurden die Stadien des Zellteilungsprozesses in tierischen Zellen anatomisch richtig erkannt. Besondere Aufmerksamkeit wurde der Kernteilung gewidmet. Walter Flemming (1843-1905) prägte für die Kernteilung die Bezeichnung „Mitose“ und hielt sie in Abbildungen so detailgerecht fest, dass diese Zeichnungen auch nach über 150 Jahren zellbiologischer Forschung noch aktuell sind (Abb. 1) (Paweletz, 2001; Flemming W., 1882). Die frühen Pioniere der Zellforschung, wie Walter Flemming, erkannten bereits, dass gewisse, gut färbare Strukturen (bezeichnet als „Stäbchen“ oder „Chromatin“), gleichmäßig auf die neu entstehenden Zellen verteilt werden (Paweletz, 2001). Es dauerte jedoch noch gut 30 Jahre, bis von Theodor Boveri vermutet (Boveri, 1914) und schließlich experimentell bestätigt wurde, dass diese Strukturen - die Chromosomen - die Träger der Erbinformation, gespeichert in DNA sind (Avery et al., 1944).

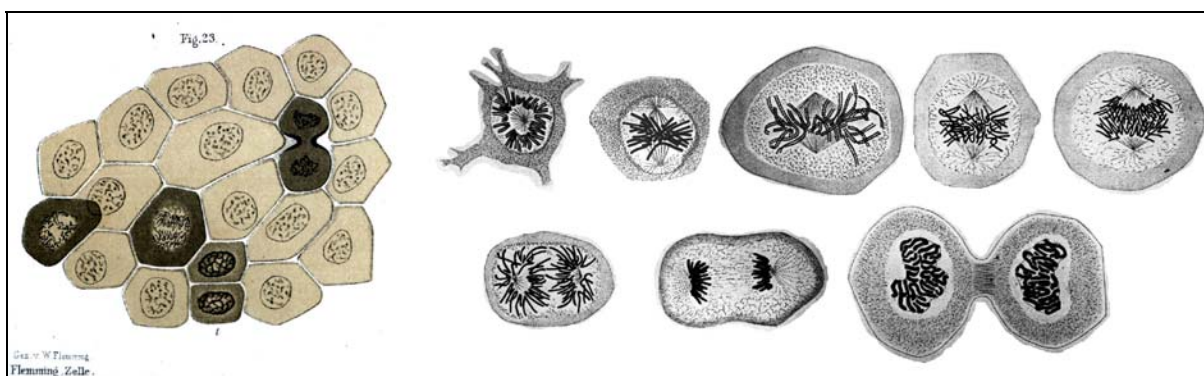


Abb. 1 : Zellteilung (Mitose) in tierischen Zellen, gesehen und gezeichnet vor über 150 Jahren.

Teilungen im Gewebeverbund sind links zu sehen, während rechts die einzelnen Phasen der Mitose im Detail dargestellt sind. Modifiziert nach Flemming W., 1882.

Diese Erkenntnis war entscheidend für das Verständnis der Zellteilung, da das Ziel der Zellteilung die Produktion von zwei genetisch identischen Tochterzellen ist. Das

genetische Material der Mutterzelle muss hierfür exakt kopiert und auf die beiden Tochterzellen verteilt werden, um das Überleben der Zelle zu gewährleisten. Zudem muss in eukaryotischen Zellen sichergestellt sein, dass die Tochterzellen je gleiche Anteile wichtiger Zellorganelle sowie je ein Centrosom erhalten. In der Mitose findet die Segregation der Chromosomen und Zellorganellen auf die Tochterzellen statt, die sich anschließend in der Zellteilung (Zytokinese) physisch trennen. Diese beiden Prozesse sind eingerahmt von Phasen, die das Zellwachstum sowie die Replikation des Genoms und der Organelle gewährleisten. Diese verschiedenen Phasen werden als Zellzyklus bezeichnet (Abb. 2). Nach A. Howard und S. R. Pelc (1951) wird der Zellzyklus in vier diskrete Phasen unterteilt: die M-Phase (M=Mitose), die G₁-Phase (G = von engl. Gap), die S-Phase (S = Synthese) und die G₂-Phase (Abb. 2). Der Zeitraum zwischen zwei Mitosen wird als Interphase zusammengefasst, während die Mitose und die Zytokinese zusammen als M-Phase bezeichnet werden. Der prinzipielle Ablauf des Zellzyklusprozesses ist in allen Eukaryoten gleich. Im Folgenden soll jedoch der Zellzyklus und die Zellteilung in tierischen Zellen, insbesondere in humanen Zellen näher betrachtet werden.

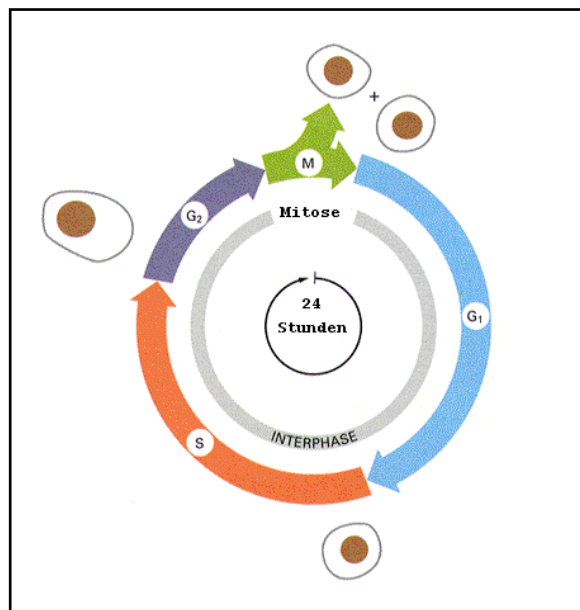


Abb. 2 : Die Zellzyklusphasen. Modifiziert nach Alberts et al., 2002.

In der S-Phase erfolgt die semikonservative Verdopplung des Genoms und der Centrosomen. Diese Phase wird gefolgt von der G₂-Phase, in der Zellwachstum erfolgt und die replizierte DNA auf Schäden kontrolliert wird. Zudem bereitet sich die Zelle auf die Mitose vor. Die M-Phase ist der aufwendigste Teil des Zellzyklus und wird von einer dramatischen Umstrukturierung der Interphasezelle begleitet: die DNA kondensiert zu Chromosomen, es erfolgen der Zusammenbruch der Kernmembran und der Aufbau des

mitotischen Spindelapparates, über welche die Chromatiden an die Spindelpole segregiert werden. Schließlich werden die Tochterzellen durch eine mechanische Einschnürung in der Zytokinese voneinander getrennt. Handelt es sich um proliferativ aktive Zellen, treten die neu entstandenen Zellen nach der Mitose in eine weitere Wachstums- und Produktionsphase, die G_1 -Phase, ein. Durch äußere Signale können die Zellen aber auch in eine Ruhephase, die so genannte G_0 -Phase übergehen. (für eine Übersicht über den Zellzyklus und die Mitose siehe Alberts et al., 2002). Die Regulation des Zellzyklus erfolgt in erster Linie über Transkription sowie reversible Protein-Phosphorylierung und –Abbau. Proteolyse wird hierbei vor allem durch Phosphorylierung reguliert, während Proteinkinasen unter anderen durch proteolytischen Abbau kontrolliert werden. Schlüsselenzyme dieser Regulation sind die Cyclin-abhängigen Kinasen (Cdk), wobei Cdk1 als ein Hauptregulator des Zellzyklus angesehen werden kann (Nigg, 1995). Cdk's sind Serin-Threonin-Proteinkinasen, die durch Bindung an ihre regulatorischen Untereinheiten, die Cycline und inhibitorische Faktoren, sowie durch Phosphorylierung positiv beziehungsweise negativ reguliert werden (Morgan, 1997). Hierbei bilden die verschiedenen Mitglieder der Cdk-Familie mit ihren entsprechenden Cyclinen Zellzyklusphasen-spezifische Komplexe. So sind unterschiedliche Cdk-Cyclin Komplexe an die Regulation der S-Phase (Cdk2/CyclinA und E) und der M-Phase (Cdk1/CyclinB) beteiligt (Morgan, 1997; Nigg, 1995). Neben dieser zeitlichen Kontrolle, existiert auch eine räumliche Koordination der Enzyme, die den Zellzyklus regulieren (Pines, 1999).

Die Duplikation und Verteilung des genetischen Materials erfolgt mit höchster Präzision. Es können jedoch Fehler in der S-Phase und der Mitose auftreten, welche zu einer ungleichen Verteilung des Chromosomensatzes (Aneuploidie) führen. Dies hat meist fatale Konsequenzen für die Zellen, da die resultierenden Ungleichgewichte von Genprodukten zum programmierten Zelltod, der Apoptose, beziehungsweise zu unkontrollierten Zellwachstum führen können. Um dies zu vermeiden, bestehen Kontrollpunkte, so genannte „Checkpoints“, die ein Fortschreiten im Zellzyklus verhindern, wenn Fehler in vorausgehenden Prozessen aufgetreten sind. Somit ist sichergestellt, dass Fehler erneut repariert werden, beziehungsweise die fehlerhafte Zelle durch Apoptose eliminiert wird. „Checkpoints“ dienen der Qualitätskontrolle und lenken die sequenzielle Abfolge der Zellzyklus-Ereignisse (Hartwell und Weinert, 1989). So wird zum Beispiel die Reduplikation des genetischen Materials in der S-Phase hierdurch verhindert. Wichtige „Checkpoints“ in Eukaryoten sind der „DNA-Damage-Checkpoint“ am Ende der G_1 -Phase, der G_2 -DNA-Damage-Checkpoint am G_2 /M Übergang, sowie der

Spindel-(Aufbau)-„Checkpoint“ in der Mitose (Gorbsky, 2001; Murray, 1992). Der DNA-Damage-Checkpoint kontrolliert, dass das genetische Material fehlerfrei ist, bevor die Zelle in die S-Phase eintritt. Ein wichtiger Regulator dieses Checkpoints ist p53. Das p53 Protein ist der Prototyp eines Tumorsuppressorgens (Finlay et al., 1989). Es integriert eine Vielzahl von Signalen im DNA-Damage-Checkpoint und garantiert so die genomische Integrität der Zelle (Lane, 1992; Wahl und Carr, 2001). Der Spindel-Checkpoint gewährleistet, dass die Chromosomen korrekt an der mitotischen Spindel angeordnet sind, bevor diese segregiert werden. Weitere Kontrollpunkte überwachen den erfolgreichen Abschluss der DNA-Duplikation sowie die Orientierung und Positionierung der mitotischen Spindel (Clarke und Gimenez-Abian, 2000; Nigg, 2001; Smith et al., 2002). Reversible Protein-Phosphorylierung durch Proteinkinasen ist hierbei ein zentraler Regulationsmechanismus dieser Zellzykluskontrollpunkte.

Die M-Phase

Die M-Phase ist die Zellzyklusphase, die mit der größten Umstrukturierung in der Zelle einhergeht. Sie lässt sich nach morphologischen Gesichtspunkten in diskrete Abschnitte unterteilen: Die Prophase, Prometaphase, Metaphase, Anaphase, Telophase und die Zytokinese (Abb. 3) (für eine Übersicht siehe Alberts et al., 2002).

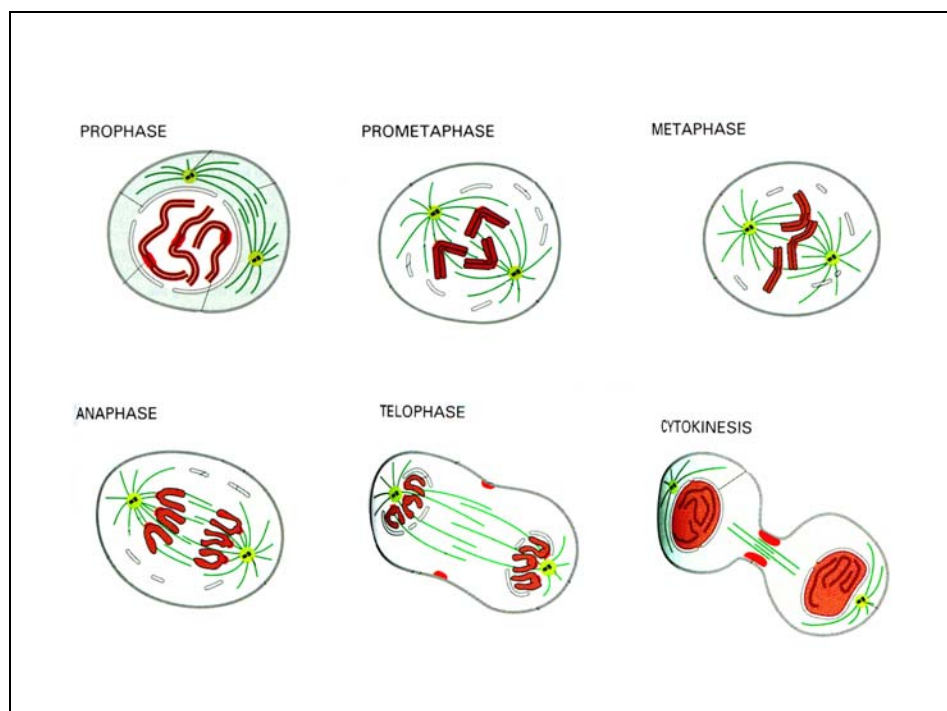


Abb. 3 : Phasen und Ablauf der Mitose in tierischen Zellen. Modifiziert nach Alberts et al., 2002.

Dieser klassischen Einteilung liegen molekulare Regulationsmechanismen zugrunde, die als Marker der Phasen verwendet werden können (Pines und Rieder, 2001). In der Prophase kondensieren die Chromosomen, und die Kernmembran beginnt sich aufzulösen. Die Centrosomen teilen sich und wandern in der Prometaphase an zwei diametrale Pole, welche die Spindelpole definieren. Die Mikrotubuli, welche die Interphasezelle durchziehen, beginnen sich neu zu organisieren. Sie formen zwischen diesen Polen die mitotische Spindel (siehe unten) (Compton, 2000). Die Chromosomen werden an den Kinetochoren bipolar an die Spindel-Mikrotubuli verankert. Dies ist ein komplexer Vorgang der unter anderen durch das dynamische Suchen und Festhalten der Mikrotubuli durch die Kinetochore vermittelt wird (McIntosh et al., 2002). Kinetochore sind komplexe Proteinstrukturen, welche an einer speziellen DNA-Domäne, dem Centromer, aufgebaut werden und die Interaktion der Chromatide mit den Mikrotubuli vermitteln (Rieder und Salmon, 1998; Biggins und Walczak, 2003). Durch die Dynamik der Mikrotubuli und die Aktion von Motorproteinen ordnen sich die Chromosomen in der Metaphase im äquidistanten Abstand zwischen den Spindelpolen, der Metaphaseplatte, an. Sind alle Chromosomen angeordnet und korrekt bipolar an die Spindel-Mikrotubuli gebunden, wird die Anaphase eingeleitet. Dieser Übergang wird durch freie, nicht gebundene Chromosomen inhibiert. Wichtig ist hierbei auch physische Spannung an den Kinetochoren, welche durch bipolare Interaktion der Schwesterchromatide mit den Mikrotubuli aufgebaut wird (Shah und Cleveland, 2000). Über konservierte Komponenten des Spindel-Checkpoints, wie dem Protein Mad2, wird dieser an nicht gebundenen, beziehungsweise monoorientierten Kinetochoren aktiviert (Shah und Cleveland, 2000). Der Spindel-Checkpoint verhindert durch Inaktivierung des Anaphase-Promoting-Complex / Cyclosome (APC/C) den Eintritt der Zelle in die Anaphase (Yu, 2002). Der APC/C ist ein Ubiquitin-Ligase Komplex, der Proteine über Ubiquitinierung dem Proteasom-abhängigen Abbau zuführt (Peters, 2002). Er ist entscheidend am Abbau wichtiger mitotischer Proteine, wie den Cyclinen beteiligt. In der Mitose liegt der APC/C als Komplex mit Cdc20 vor, wohingegen er ab der Anaphase einen Komplex mit Cdh1 bildet (Peters, 2002; Zachariae und Nasmyth, 1999). Diese beiden Komplexe zeigen eine unterschiedliche Substratspezifität. Während der APC/C^{Cdc20} Substrate mit einer so genannten D-Box (=engl. destruction) erkennt (Glutzer et al., 1991; King et al., 1996), vermittelt der APC/C^{Cdh1} zusätzlich den Abbau von Substraten mit einem KEN-Motiv (Pfleger und Kirschner, 2000). In der Anaphase bewirkt der APC/C den Abbau der Cohesine, die die Schwesterchromatide zusammenhalten (Peters, 2002). Die freien Chromatiden können

dann über Mikrotubuli-Dynamik und die Aktion von molekularen Motoren an die Spindelpole segregiert werden. Die Kernmembranen bilden sich in der Telophase zurück und die Chromosomen dekondensieren. In der Zytokinese, die in der Anaphase beginnt, erfolgt schließlich die Trennung der neu entstandenen Zellen. Die Furchungsspalte, ein kontraktile Actomyosin-Ring, beginnt sich zu verengen, bis die Zellen nur noch über eine dünne zytoplasmatische Brücke verbunden sind (Glotzer, 2001). Diese Brücke enthält eine Struktur gebündelter Mikrotubuli und assoziierter Proteine, den so genannten Mittelkörper. Dieser ist entscheidend an der Regulation der Zytokinese beteiligt. Schließlich wird der letzte Kontakt zwischen den Zellen, unter anderem durch Modulation der Zellmembran-Zusammensetzung aufgelöst (Glotzer, 2001).

Die Regulation der Ereignisse in der M-Phase erfolgt in erster Linie über reversible Phosphorylierung durch Cdk1/CyclinB sowie durch Proteinabbau. Phosphorylierungen durch Cdk1/CyclinB leiten die Mitose ein, wohingegen der Abbau von CyclinB durch den APC/C Cdk1 in der Anaphase inaktiviert und so den Austritt aus der Mitose einleitet (Peters, 2002). Um die oben beschriebenen komplexen Vorgänge zu orchestrieren, ist jedoch ein Netzwerk weiterer regulatorischer Kinasen notwendig. Viele diese Kinasen sind spezifisch in der M-Phase aktiv und werden daher als mitotische Kinasen bezeichnet. Wichtige konservierte mitotische Kinasen sind Mitglieder aus den Familien der Polo, Aurora und NIMA-Kinasen (Nigg, 2001).

Das markanteste Merkmal der Mitose ist der Spindelapparat, der komplexen Organisations- und Regulationsmechanismen unterliegt, wie im nächsten Kapitel genauer dargestellt wird.

Aufbau und Regulation der mitotischen Spindel

Mikrotubuli sind die strukturellen Bestandteile der mitotischen Spindel. Sie sind dynamische Polymere, die aus α/β -Tubulin Dimeren aufgebaut sind (Desai und Mitchison, 1997). Bindung und Hydrolyse von GTP durch β -Tubulin führen zu einem kontinuierlichen Ein- und Abbau von α/β -Tubulin Dimeren an den Enden der Mikrotubuli, der so eine Polarisierung der Mikrotubuli bedingt. Mikrotubuli sind daher polare Strukturen, mit einem schnell wachsenden Ende (Plusende) und einem langsam wachsenden Ende (Minusende). Durch unterschiedliche Tubulin-Konzentrationen in der Zelle und die Wirkung von Mikrotubuli-assoziiierter-Proteinen (MAPs) wird diese

Mikrotubuli-Dynamik beeinflusst, was zur dynamischen Instabilität der Mikrotubuli führt (Walczak, 2000; Desai und Mitchison, 1997).

Die Spindel selbst ist eine komplexe Anordnung von antiparallel orientierten hoch dynamischen Mikrotubuli. Man kann verschiedene Typen von Mikrotubuli in der Spindel unterscheiden: astrale Mikrotubuli, welche die Spindelpole mit der Zellkortex verbinden, interkonnektierende Mikrotubuli, welche über Motorproteine in Kontakt mit Mikrotubuli des anderen Spindelpols stehen, Kinetochor-Mikrotubuli (K-Fibers), welche die Spindelpole und die Kinetochore verbinden und Mikrotubuli, welche die Spindelpole mit den Chromosomen-Armen verbinden (Abb. 4) (Wittmann et al., 2001; Sharp et al., 2000; Compton, 2000).

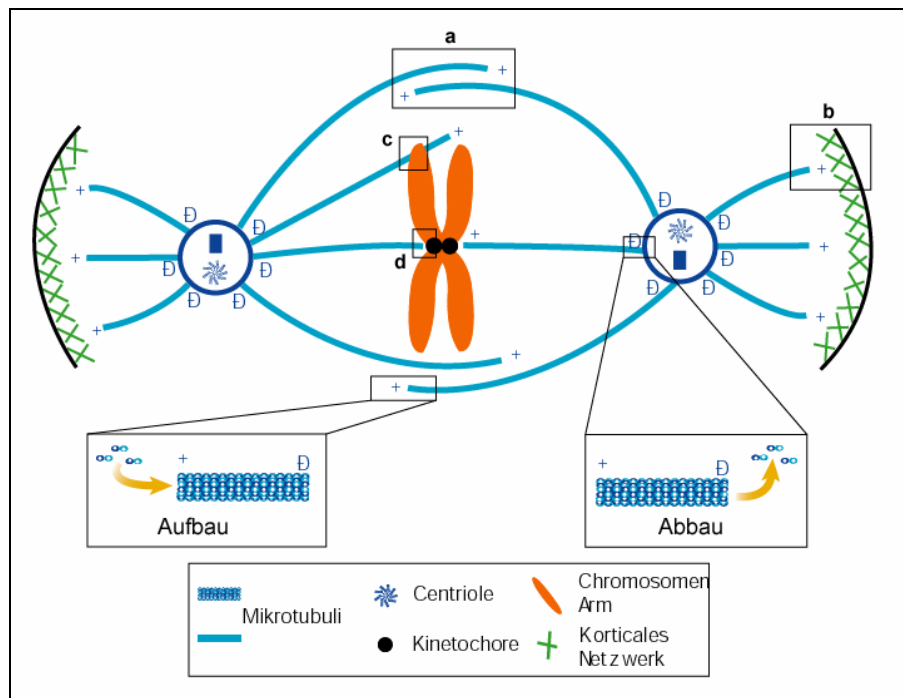


Abb. 4 : Aufbau der mitotischen Spindel.

a: interkonnektierende Mikrotubuli, b: astrale Mikrotubuli, c: chromosomale Mikrotubuli, d: Kinetochor Mikrotubuli ; Modifiziert nach Sharp et al., 2000.

Die Mikrotubuli der mitotischen Spindel sind von den Mikrotubulus-Organisationszentren (MTOCs), den Spindelpolen, organisiert, welche deren Minusenden verankern (siehe unten). Die Regulation der Verankerung und der Dynamik der Mikrotubuli-Minusenden an den Spindelpolen ist äußerst komplex und Gegenstand der aktuellen Forschung. Ein wichtiger regulatorischer Mechanismus ist hier das Zusammenspiel von Mikrotubuli stabilisierenden und destabilisierenden Faktoren, so genannten „Katastrophen“. Dies konnte explizit für die evolutionär konservierten

Proteine XKCM1 und XMAP215 aus *Xenopus laevis* gezeigt werden (Andersen und Wittmann, 2002; Kinoshita et al., 2001; Tournéize et al., 2000). Proteine die mit diesen Regulatoren interagieren, bilden ein regulatorisches Netzwerk. Die Transforming-Acid-Coil-Coiled Proteine (TACC), deren Homolog in *Drosophila melanogaster* mit Mps/XMAP215 assoziiert, sind ein Beispiel für solche essentiellen Komponenten der mitotischen Spindel in Vertebraten (Piekorz et al., 2002; Lee et al., 2001).

Zur räumlichen Trennung der Spindelpole in der Prometaphase und der späten Anaphase, sowie zur Vernetzung und Bündelung von Mikrotubuli, sind Kräfte notwendig. Diese werden von Motorproteinen generiert, welche Mikrotubuli binden und sich unter ATP Hydrolyse gerichtet entlang dieser Mikrotubuli bewegen (Schliwa und Woehlke, 2003). Motorproteine spielen eine essentielle Rolle beim Aufbau und der Aufrechterhaltung der Struktur der mitotischen Spindel (Scholey et al., 2003; Wittmann et al., 2001). So sind Motorproteine alleine ausreichend, um Mikrotubuli in Asten zu organisieren (Nedelec et al., 1997). Die Modellierung solcher Systeme *in silico* zeigt ferner, dass die Dynamik der Mikrotubuli, sowie die Annahme eines bipolaren Motors, ausreichend ist, um sogar spindelartige Strukturen zu generieren (Nedelec, 2002; Nedelec et al., 2003). Der Aufbau der mitotischen Spindel ist somit ein weitgehend selbstorganisierender Prozess, dem das Zusammenspiel von Mikrotubuli-Dynamik und Motorproteinen zugrunde liegt.

Die „Sortierung“ der antiparallelen, interkonnektierenden Mikrotubuli, welche die Spindelstruktur bedingt, liegt ein Gleichgewicht aus dem Zusammenwirken von Minus- und Plusende orientierten Motorproteinen zugrunde. Dies wurde am Beispiel des Kinesin-ähnlichen Motors Eg5 gezeigt. Eg5 spielt eine essentielle Rolle in der Mitose, wobei dessen Aktivität an der Spindel im Gleichgewicht mit dem Kinesin-ähnlichen Protein HSET steht (Blangy et al., 1995; Mountain et al., 1999). So bewirkt die Inhibition von Eg5 durch Antikörperinjektion beziehungsweise einen chemischen Inhibitor die Auflösung der bipolaren Spindel (Blangy et al., 1995; Mayer et al., 1999).

Um die Funktion der Spindel sicherzustellen, unterliegt diese der Kontrolle durch ein komplexes Netzwerk regulatorischer Aktivitäten. Diese beinhalten neben der Interaktion der Mikrotubuli mit MAPs und den Kinetochoren, auch die Nukleation der Mikrotubuli an den Spindelpolen und reversible Protein-Phosphorylierung durch mitotische Kinasen (Nigg, 2001). So werden wichtige Mikrotubuli-Regulatoren, wie Eg5 und der Mikrotubuli Destabilisierungsfaktor Stathmin/Op18 direkt über Phosphorylierung durch Cdk1 reguliert (Larsson et al., 1997; Blangy et al., 1995).

Neben den Spindelpolen als wichtigste Mikrotubuli-Nukleationszentren existiert, vor allem in meiotischen Systemen und Zellen mit acentrosomalen Polen, auch eine Chromatin-vermittelte Mikrotubuli-Nukleation. Dies konnte für *X.laevis* Oozyten-Zellextrakte etabliert werden, in denen mit DNA bestückte Kügelchen die Nukleation von Mikrotubuli und schließlich die Ausbildung einer Spindel, ausgehend von diesen Kügelchen, induzieren (Karsenti und Vernos, 2001). Es wurde gezeigt, dass dies durch die Rho ähnliche GTPase Ran reguliert wird. (Dasso, 2002; Kalab et al., 2002). Da der GTP-Austauschfaktor für Ran (RCC1) Chromatin-gebunden vorliegt, wohingegen die GTPase für Ran (RanGAP) primär ein lösliches Protein ist (Trieselmann und Wilde, 2002), formt sich ein Gradient aus RanGTP um die Chromosomen (Dasso, 2002; Kalab et al., 2002). Dieser Mechanismus scheint jedoch vornehmlich in großen Zellen, wie *X.laevis* Oozyten wichtig zu sein, in denen ein solcher Gradient auch experimentell nachgewiesen werden kann (Kalab et al., 2002).

Faktoren, die über RanGTP reguliert werden, konnten isoliert werden. Das Mikrotubuli bindende Protein TPX2 (Targeting Protein for Xklp2), ein Lokalisierungs-Faktor für das Motorprotein Xklp2 in *X.laevis* (Wittmann et al., 1998; Wittmann et al., 2000), und NuMA (Nuclear/Mitotic Apparatus Protein), ein essentielles Protein der Spindelpole (Merdes et al., 1996), sind hierbei zentrale Komponenten. Sie sind in der Interphase nukleäre Proteine und liegen in der Mitose als Komplexe mit den Zellkern-Importfaktoren Importin α/β vor. Durch RanGTP werden diese Komplexe aufgelöst und TPX2 beziehungsweise NuMA aktiviert (Wiese et al., 2001; Nachury et al., 2001; Gruss et al., 2001). Neue Daten lassen vermuten, dass RanGTP auch in humanen Zellen ein wichtiger Regulator der Spindelformation ist, wobei RanGTP auch Funktionen bei der Regulation centrosomaler Komponenten, wie AKAP450, auszuüben scheint (Gruss et al., 2002; Keryer et al., 2003).

Centrosomen und der Centrosomen-Zyklus

Centrosomen wurden bereits 1875 von Walter Flemming als teilungsspezifische Organelle der eukaryotischen Zelle beschrieben (Flemming, 1875) und Theodor Boveri prägte, aufgrund ihrer Lage in der Interphasezelle, die Bezeichnung „Centrosom“ (Boveri, 1888). Centrosomen sind in unterschiedlicher anatomischer Erscheinung und molekularer Zusammensetzung in den meisten Eukaryoten, mit Ausnahme der meisten höheren

Pflanzen, zu finden. In der Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*), wird das Centrosomen-Analogon entsprechend als Spindelpolkkörperchen bezeichnet (Francis und Davis, 2000). Centrosomen bilden das Mikrotubulus-Organisationszentrum der Zelle (MTOC) und beeinflussen die Zellstruktur durch Nukleation zytoplasmatischer Mikrotubuli (Kellogg et al., 1994; Kirschner und Mitchison, 1986). Interphasezellen enthalten zunächst ein einziges Centrosom, welches nahe am Kern gelegen ist und aus zwei unterschiedlich modifizierten Centriolen, dem Mutter- und Tochtercentriol aufgebaut ist (Abb. 5A). Die Centriolen in humanen Zellen bestehen aus neun Mikrotubuli-Triplets und sind von einer elektronendichten Wolke, der pericentrioläre Matrix (PCM) umgeben (Abb. 5A) (Bornens et al., 1987; Vorobjev und Nadezhdina, 1987; Preble et al., 2000). Die PCM ist ein fibrilläres Netzwerk, welches als Verankerung für viele funktionelle Komponenten dient (Schnackenberg und Palazzo, 1999). Ein wichtiger Bestandteil der PCM ist γ -Tubulin (Joshi et al., 1992) und der γ -Tubulin Ringkomplex (γ -TuRC) (Dicthenberg et al., 1998). Dieser reguliert die Nukleation und Verankerung der Mikrotubuli in der PCM (Schiebel, 2000; Wiese und Zheng, 1999). Neben diesen essentiellen Proteinen sind eine Reihe weiterer Proteine bekannt, welche in der PCM residieren, wobei eine Charakteristik der meisten centrosomalen Proteine das Vorhandensein von coiled-coiled Domänen ist (Andersen et al., 2003; Salisbury, 2003). Die Centrosomen werden in der S-Phase semikonservativ dupliziert; Somit sind in der G₂-Phase und Mitose zwei Centrosomen (mit je zwei Centriolen) vorhanden. Sie bilden die Spindelpole und organisieren die bipolare mitotische Spindel (Abb. 5B).

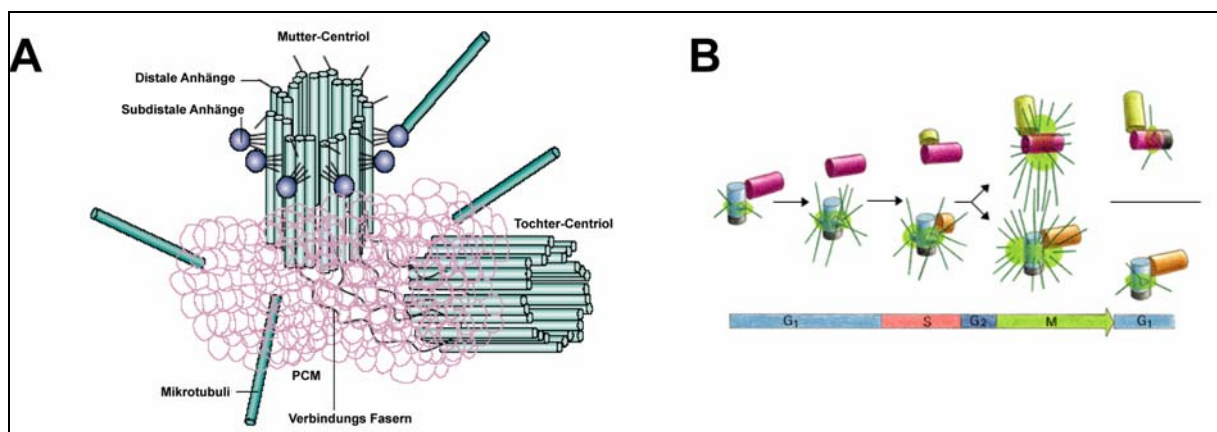


Abb. 5 : (A) Schematischer Aufbau eines Centrosoms. (B) Der Centrosomen-Zyklus.

Modifiziert nach Alberts et al., 2002 und Doxsey, 2001.

Neben dem Kernzyklus besteht somit ein Centrosomen-Zyklus, der in die Phasen Duplikation, Reifung und Separation unterteilt werden kann (Meraldi und Nigg, 2002). Es ist hierbei entscheidend, dass die Centrosomen im Zellzyklus genau einmal dupliziert werden. Um dies sicherzustellen, unterliegt der Centrosomen-Zyklus der Zellzykluskontrolle, vermittelt durch die Aktion von Cdk2 zusammen mit den Cyclinen-A und -E (Winey, 1999; Meraldi und Nigg, 2002; Meraldi et al., 1999). Zusätzlich wird die Regulation der Duplikation durch eine Reihe struktureller und regulatorischer Proteine sichergestellt. So spielen das centrosomale Proteine ϵ -Tubulin (Chang et al., 2003), Phosphorylierung von Centrin-2 (Salisbury et al., 2002), sowie im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* die Kinase ZYG-1 (O'Connell et al., 2001) und in *X.laevis* die Calcium-Calmodulin Kinase II (CaMKII) und Calcium hierbei eine wichtige Rolle (Matsumoto und Maller, 2002).

Die Separation der duplizierten Centrosomen in der G₂-Phase unterliegt in erster Linie der Kontrolle durch die NIMA verwandte Kinase Nek2 (Fry, 2002). Nek2 selbst wird durch Cdk1 vermittelte Phosphorylierung einer Nek2 inaktivierenden Phosphatase aktiviert (Fry, 2002). Nek2 phosphoryliert daraufhin C-Nap1, was zur Ubiquitin-abhängigen Abbau von C-Nap1 führt (Fry, 2002). C-Nap1 lokalisiert in der Verbindung zwischen den beiden Centrosomen und sein Abbau ermöglicht, dass die beiden Centrosomen sich voneinander entfernen und die Spindelpole bilden (Faragher und Fry, 2003; Mayor et al., 2002).

Die Mikrotubuli der mitotischen Spindel zeigen, wie oben beschrieben, eine wesentlich höhere Dynamik im Vergleich zu den Mikrotubuli aus Interphasezellen. Die Centrosomen beziehungsweise die PCM, müssen daher in der Mitose unterschiedliche Mikrotubuli-Nukleationseigenschaften als in der Interphase aufweisen. Die Modulation der Nukleationseigenschaft erfolgt über so genannte „Reifung“ (Maturation) der Centrosomen am Ende der G₂-Phase. Dies führt zur Rekrutierung von Komponenten der PCM, vor allem γ -Tubulin, sowie einer Größenzunahme der Centrosomen. All dies führt letztlich zu einer erhöhten Mikrotubuli Nukleationsaktivität der Centrosomen. Für den Prozess der Centrosomen-Reifung sind ebenfalls Phosphorylierungen von PCM Komponenten durch die mitotischen Kinasen Cdk1/CyclinB, Plk-1 und Aurora-A (siehe unten) essentiell (Blagden und Glover, 2003; Mayor et al., 1999). Zentrales Element der Regulation des Centrosomen-Zyklus ist somit Protein-Phosphorylierung, welche auch, wie oben diskutiert, für die Regulation wichtiger Spindelkomponenten und des Zellzyklus verantwortlich ist (Mayor et al., 1999; Nigg, 2001).

Obwohl die Centrosomen lange Zeit als essentielle Organisatoren der mitotischen Spindel angesehen wurden, sind Centriole für die Organisation der Spindel *per se* nicht notwendig. So bilden höhere Pflanzen und die Oozyten einiger Tiere, wie *Mus musculus*, bipolare Spindeln mit acentrosomalen Spindelpolen. Die Organisation der Spindel ist hierbei hauptsächlich von den Komponenten der PCM und Motorproteinen abhängig. Dies zeigt sich auch in humanen Zellen, welche noch normale bipolare mitotische Spindeln bilden, wenngleich die Centrosomen durch Laser-Mikrochirurgie entfernt wurden (Khodjakov und Rieder, 2001). Centrosomen sind jedoch notwendig für die Regulation einer Vielzahl von Prozessen in unterschiedlichen Zellzyklusphasen, und es zeigt sich, dass sie als Plattform für die Integration von Signaltransduktionsprozessen dienen (Doxsey, 2001). So zeigt die Depletion von Centrosomen über Laser-Mikrochirurgie, dass die Centrosomen wichtig für die Orientierung der Spindel, den Ablauf der Zytokinese und den Wiedereintritt in die S-Phase sind (Khodjakov und Rieder, 2001). Wie die Centrosomen diese Prozesse beeinflussen, ist derzeit nur für wenige Beispiele bekannt. Eines dieser Beispiele ist die Regulation der Zytokinese, für welche eine gerichtete, Actomyosin-abhängige Bewegung des Mutter-Centriols in den Mittelkörper beobachtet wurde (Ou und Rattner, 2002; Piel et al., 2001). Wichtige mitotische Kinasen, wie Cdk1-Cyclin-B, Aurora-A und Plk1 lokalisieren am Centrosom, wobei diese Lokalisierung eine wichtige Rolle bei der Regulation der Aktivierung dieser Kinasen spielt. Dies konnte explizit für die Phosphorylierung von Cyclin-B1 durch Plk1 gezeigt werden (Jackman et al., 2003).

In Interphasezellen sind die Centrosomen zudem direkt an gerichteter Zellbewegung, Zellpolarität und Sekretion, wie zum Beispiel bei Zell-Zell Interaktionen im Immunsystem, beteiligt (Doxsey, 2001). In *Drosophila melanogaster* scheinen sie ferner auch in der Polymerisation von Aktin und im DNA-Damage-Checkpoint involviert zu sein (Takada et al., 2003; Stevenson et al., 2001).

Die Familie der Aurora Protein-Kinasen

Der klangvolle Name dieser Familie mitotischer Kinasen ist abgeleitet von der Bezeichnung des Naturereignisses der Polarlichter. Er wurde gewählt für das Gründungsmitglied der Familie, die Aurora Kinase aus *Drosophila melanogaster*. Das Aurora Gen wurde in einen genetischem Screen auf Mutanten mit Spindelpol-Defekten isoliert (Glover et al., 1995). Während alle bis dato untersuchten unizellulären Eukaryoten

nur eine einzige Aurora Kinase besitzen, exprimieren höhere Eukaryoten wie *D.melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* zwei Aurora paraloge Proteine, Aurora-A und Aurora-B, die auf unterschiedlichen Genen kodiert sind. Demgegenüber sind in Säugetieren drei verschiedene paraloge Proteine aus der Aurora Familie exprimiert (Carmena und Earnshaw, 2003).

Im menschlichen Genom existiert zusätzlich ein weiteres prozessiertes Aurora Pseudogen (Kimura et al., 1997b). Aurora homologe Proteine sind darüber hinaus auch in Pflanzen zu finden. Da Homologe sogar in Einzellern mit sehr kleinen Genomen, wie *Encephalitozoon cuniculi* (Genom: 2,5 Mb) zu finden sind, ist aufgrund ihrer starken evolutionären Konservierung davon auszugehen, dass sie in den meisten Organismen essentiell sind (Abb. 6).

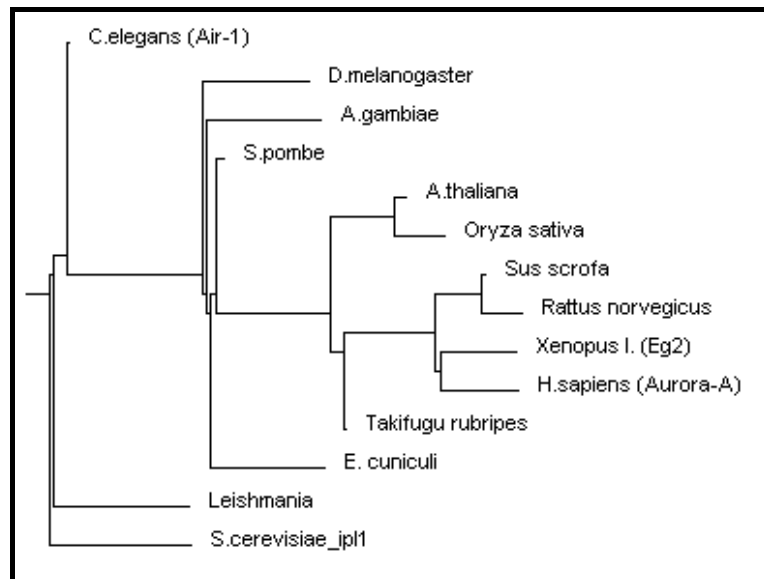


Abb. 6 : Dendrogramm Aurora(-A) homologer Proteine.

Die Nomenklatur dieser Kinasefamilie ist sehr unübersichtlich; es hat sich jedoch die Bezeichnung durchgesetzt, in welcher die drei in Säugetieren vorkommenden Aurora Kinasen als Aurora-A, Aurora-B und Aurora-C benannt werden (Nigg, 2001). Sie wird in der vorliegenden Arbeit verwendet. Für Referenzen zu den Synonymen sei der Leser auf einschlägige Reviews und Datenbanken verwiesen (Nigg, 2001).

Aurora Kinasen sind funktionelle Serin-Threonin Proteinkinasen (EC 2.7.1.37), deren Kinasedomäne eine Homologie zu Mitgliedern der PKA-Familie zeigt. Die Aurora-Kinasen stellen jedoch eine eigenständige Kinasefamilie dar, definiert durch die spezifische Konsensussequenz „DFGWSxxxxxxxxRxTxCGTxDYLPPE“ in der

katalytischen Domäne (Abb. 7) (Giet und Prigent, 1999). Die im Carboxylterminus gelegenen katalytischen Domänen der verschiedenen Aurora Typen, sind untereinander sehr stark konserviert (71 % Identität zwischen der humanen Aurora A-, B-Kinasedomäne). Demgegenüber divergiert der amino- und der letzte carboxyterminale Bereich der verschiedenen Mitgliedern stark. Im aminoterminalen Bereich existieren jedoch, je nach Typ zwei bis drei, konservierte Motive, die als Aurora-Boxen bezeichnet werden (Bischoff und Plowman, 1999; Katayama et al., 2003). Die Funktion dieser konservierten Domänen ist, bis auf die Ausnahme von Aurora-A (siehe unten), derzeit noch nicht bekannt. Im carboxyterminalen Bereich der Kinasedomäne aller Aurora Mitglieder, ist ferner eine konservierte D-Box (Destruction Box) vorhanden (Abb. 7). Zumindest für Aurora-A konnte gezeigt werden, dass diese Domäne funktionell ist und den Abbau der Kinase reguliert (Castro et al., 2002a; Honda et al., 2000; Taguchi et al., 2002).

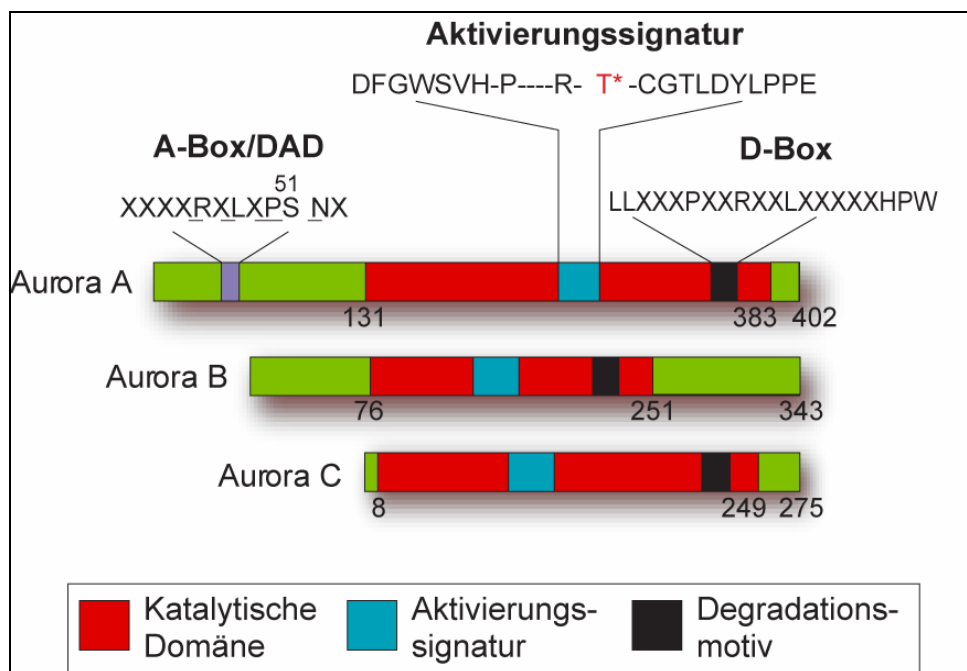


Abb. 7 : Struktur der humanen Aurora-A –B und –C Kinasen.

Schematischer Aufbau der drei Aurora Kinasentypen. Modifiziert nach Carmena und Earnshaw, 2003.

Alle Aurora Kinasen sind maximal in der Mitose exprimiert und lokalisieren typenspezifisch an unterschiedliche mitotische Substrukturen, wie der mitotischen Spindel, den Centrosomen beziehungsweise Spindelpolkkörperchen und den Kinetochoren (Carmena und Earnshaw, 2003). Aurora Kinasen sind in der Kontrolle des Centrosomen- und des Kernzykluses involviert (Andrews et al., 2003). So haben sie eine zentrale Rolle in der mitotischen Progression und werden für den Ablauf der Zytokinese benötigt (Carmena und

Earnshaw, 2003). Die exakte Lokalisation und Funktion der verschiedenen Vertreter der Familie der Aurora-Kinasen soll im Folgenden näher erläutert werden.

Wie oben erwähnt, exprimieren auch Algen und höhere Pflanzen Aurora Homologe Proteine. Der einzige, bisher charakterisierte, funktionelle Vertreter aus dieser Gruppe ist CALK (Chlamydomonas Aurora/Ipl1p-like Protein Kinase) aus der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* (Pan und Snell, 2003; Pan und Snell, 2000).

Das Aurora Homolog IPL1 (increase-in-ploidy 1) der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* ist eines der Gründungsmitglieder der Aurora-Kinasefamilie und die einzige in *S.cerevisiae* exprimierte Aurora Kinase. Sie wurde in einen Screen auf Chromosomen-Missegregation identifiziert (Chan und Botstein, 1993). Die Regulation der Kinaseaktivität von Ipl1p ist äußerst komplex. Die beiden wichtigsten Regulatoren sind die Proteinphosphatase 1 (PP1) mit deren regulatorischen Untereinheit Glc7p und das Sli15 Protein. Negative Regulation erfolgt durch Dephosphorylierung von Ipl1p durch Glc7p (Francisco und Chan, 1994; Francisco et al., 1994). Demgegenüber wird Ipl1p durch Bindung an Sli15p aktiviert (Kim et al., 1999) (Kang et al., 2001). Sli15p ist ein Homolog des Inner-Centromere-Proteins (INCENP) aus Vertebraten. Erste Hinweise auf die Funktion von Ipl1p lieferten Mutanten, bei denen eine veränderte Mikrotubuli-Interaktion an den Kinetochoren beobachtet wurde (Biggins et al., 1999). Dass Ipl1p eine Funktion in der Regulation der Interaktion der Mikrotubuli mit den Kinetochoren hat, bestätigte die Beobachtung, dass sowohl Ipl1p als auch seine Substrate und Bindungspartner Sli15p und Dam1p an Kinetochore lokalisieren und direkt an Mikrotubuli binden können (Kim et al., 1999; Kang et al., 2001).

Weiterführende Studien zeigten, dass Ipl1p in der Spindel-Checkpoint Antwort involviert ist und als Sensor die Spannung an Mikrotubuli-gebundenen Kinetochoren überwacht (Biggins und Murray, 2001). Dies konnte durch elegante Studien bestätigt werden, die zeigen, dass Phosphorylierungen von Dam1p und weiteren Komponenten des Dam1-Komplexes durch Ipl1p essentiell für die bipolare Verankerung der Chromosomen an die Spindel ist (Tanaka et al., 2002b; Shang et al., 2003; Cheeseman et al., 2002).

Interessant, vor allem im Hinblick auf die Funktion der Ipl1p orthologen Kinasen ist, dass Ipl1p auch den Austritt aus der Mitose reguliert. Die Kinaseaktivität von Ipl1p steigt in der Anaphase und Ipl1p lokalisiert an die Enden interpolarer Mikrotubuli an der Spindel Mittelzone („Spindle Midzone“). Hier ist die Kinase für den Abbau der mitotischen Spindel notwendig und co-lokalisiert mit Substraten wie Ndc10p (Buvelot et al., 2003).

Die Spaltheife *Schizosaccharomyces pombe*, exprimiert ebenfalls nur ein einziges Aurora Homolog, Ark1p. Ark1p lokalisiert ebenfalls an die mitotische Spindel (Petersen et al., 2001) und scheint Ipl1p in seiner Funktion und Regulation sehr ähnlich. So wird auch für Ark1p eine Funktion als Spannungssensor an den Kinetochoren angenommen (Petersen und Hagan, 2003).

Die meisten Aurora Kinasen unizellulärer Eukaryoten sind somit wichtige Regulatoren der Kinetochor-Funktion, des Spindel-Checkpoints und der mitotischen Spindel. Diese Funktionen haben sich im Laufe der Evolution vermutlich getrennt, so dass in Organismen, welche mehrere Aurora paraloge Kinasen exprimieren, Aurora-A primär in der Regulation der Spindel involviert ist, während Aurora-B hauptsächlich die Funktion in der Regulation der Kinetochor/Mikrotubuli Interaktion und der Zytokinese übernommen hat (Giet und Prigent, 1999). Demgegenüber hat Aurora-C anscheinend eine Meiose-spezifische Funktion (Kimura et al., 1999).

Die Aurora-B Kinase ist in Säugetieren vor allem im Thymus und weiteren teilungsaktiven Geweben exprimiert (Kimura et al., 1998; Bischoff et al., 1998). Die mRNA, der Proteinspiegel und die Kinaseaktivität sind in der Mitose höher als in der Interphase (Kimura et al., 1998; Bischoff et al., 1998). Regulation der Aurora-B Kinaseaktivität erfolgt analog zu Ipl1p durch Autophosphorylierung und Wechselwirkung mit Bindungspartnern, sowie über Protein-Abbau am Ende der Mitose (Bischoff et al., 1998; Terada et al., 1998). Wie genau Aurora-B am Ende der Mitose abgebaut wird, ist derzeit nicht bekannt. Überraschenderweise scheint dies jedoch unabhängig vom APC/C reguliert zu sein (Castro et al., 2002b).

Im Einklang mit einer Funktion im Spindel-Checkpoint, ist Aurora-B in der Pro-, Prometa- und Metaphase an den Kinetochoren und in der Anaphase am so genannten Mittelkörper lokalisiert (Bischoff et al., 1998). Eine solche Lokalisation ist typisch für die chromosomalen Passenger-Proteine, zu welchen neben Aurora-B die Proteine INCENP, TD-60 und Survivin zählen (Adams et al., 2001a). Diese Lokalisation von Aurora-B ist abhängig von der Kinaseaktivität (Honda et al., 2003).

Aurora-B liegt in der Zelle als Komplex mit den Proteinen INCENP und Survivin vor (Bolton et al., 2002). Die Interaktion von Aurora-B und Survivin wird anscheinend vor allem über INCENP vermittelt (Bolton et al., 2002). Diese Komplexbildung mit Aurora-B ist für die Lokalisation von Aurora-B und *vice versa* für die Lokalisierung von INCENP und Survivin essentiell (Adams et al., 2001a; Terada et al., 1998; Adams et al., 2000; Wheatley et al., 2001). Die Bindung von INCENP an Aurora-B aktiviert ferner die

Kinaseaktivität von Aurora-B *in vitro*, wobei Phosphorylierung von INCENP durch Aurora-B deren Aktivität steigert (Bishop und Schumacher, 2002; Honda et al., 2003). Diese Aktivierung von Aurora-B ist durch (auto)Phosphorylierung vermittelt, da Behandlung dieses Komplexes mit Phosphatasen die Kinaseaktivität von Aurora-B eliminiert (Bishop und Schumacher, 2002; Honda et al., 2003). Die Interaktion mit Survivin steigert ferner die Kinaseaktivität dieses Komplexes *in vivo*, wobei Survivin alleine nicht ausreichend ist, um Aurora-B *in vitro* zu aktivieren (Honda et al., 2003; Chen et al., 2003).

Um die Funktion von Aurora-B zu ergründen, wurde Aurora-B in verschiedenen Organismen depletiert beziehungsweise inaktiviert. Injektion von Aurora-B Antikörpern in *X.laevis* XTC Zellen führt zur Umstrukturierung des Mikrotubuli-Netzwerkes und der Destabilisierung der Kinetochor-Mikrotubuli. Ferner sind hierbei Fehler in der Metaphasenplatten-Anordnung der Chromosomen und die Inaktivierung des Nocodazol-induzierten Spindel-Checkpoints zu beobachten (Kallio et al., 2002). Antikörper Injektion in Oocyten-Extrakte zeigt ferner, dass Aurora-B für die Etablierung und Aufrechterhaltung des Spindel-Checkpoints notwendig ist (Kallio et al., 2002). Depletion der humanen Aurora-B Kinase über siRNA sowie Inhibition der Kinaseaktivität mit dem spezifischen Inhibitor „Hesperadin“ bestätigen eine Funktion von Aurora-B im Spindel-Checkpoint und in der Zytokinese (Hauf et al., 2003). Ferner konnte durch diese Studien gezeigt werden, dass die Destabilisierung der Kinetochor-Mikrotubuli durch Aurora-B notwendig ist, diejenigen Mikrotubulibindungen an den Schwester-Kinetochoren aufzulösen, die mit nur einem Spindelpol verbunden sind (syntelische Bindung). Hierdurch kann der Spindel-Checkpoint an solchen monoorientierten Chromosomen aktiviert werden (Hauf et al., 2003). Studien mit einem weiteren Aurora-A und -B spezifischen Inhibitor (ZM447439) zeigen, dass Aurora-B Kinaseaktivität zudem essentiell für die Rekrutierung der Spindel-Checkpoint Komponenten BubR1, Mad2 und CENP-E an die Kinetochoren und die Phosphorylierung von BubR1 ist (Ditchfield et al., 2003). Aurora-B phosphoryliert an den Kinetochoren des weiteren die Proteine Survivin, INCENP, Histon H3 und CENP-A (Crosio et al., 2002; Goto et al., 2002). Aurora-B beeinflusst somit den Spindel-Checkpoint über die Rekrutierung und Modifikation dieser evolutionär konservierten Proteine. Zudem wird für Aurora-B eine Funktion als Spannungs-Sensor an den Kinetochoren angenommen, wobei Survivin essentiell für diese Funktion ist (Lens et al., 2003).

Aurora-B ist darüber hinaus ein wichtiger Regulator der Zytokinese. Hierbei spielt die Rekrutierung von Aurora-B an den Mittelkörper, vermittelt durch Phosphorylierung

von CENP-A, eine entscheidende Rolle (Zeitlin et al., 2001). Fehler in der Zytokinese sind auch nach Überexpression einer katalytisch-inaktiven Form von Aurora-B in humanen Zellen, sowie nach siRNA von Aurora-B in *D.melanogaster* zu beobachten (Tatsuka et al., 1998; Terada et al., 1998; Adams et al., 2001c; Giet und Glover, 2001). Dieser dominant negative Phänotyp impliziert, dass die Phosphorylierung von Aurora-B Substraten für den Abschluss der Zytokinese nötig ist. Weitere Kandidaten für solche Aurora-B Substrate sind die Typ III intermediären Filament-Proteine Vimentin, Desmin und GFAP, für die eine Rolle in der Formation des kontraktilen Rings angenommen wird. Aurora-B reguliert durch Phosphorylierung negativ die Polymerisations-Dynamik dieser Filament-formenden Proteine (Goto et al., 2003; Kawajiri et al., 2003).

Neben der Regulation der Polymerisierung von intermediären Filamenten scheint Aurora-B die Zytokinese ferner über die Lokalisierung des Centralspindlin-Komplexes an der Teilungsfurche zu kontrollieren. Dieser evolutionär konservierte, tetramere Komplex enthält das Kinesin Mklp1, sowie MgcRacGAP, ein GTPase aktivierendes Protein (GAP), welches den Aktinmodulator Rho reguliert (Mishima et al., 2002). GTPasen des Rho Typs sind entscheidend für den Ablauf der Zytokinese. Aurora-B ist in diesen Prozess involviert, indem es MgcRacGAP phosphoryliert, wodurch die MgcRacGAP Aktivität zugunsten von Rho moduliert wird (Minoshima et al., 2003). Aurora-B fungiert neben der oben beschriebenen Funktion im Spindel-Checkpoint somit auch als ein wichtiger Regulator der Zytokinese.

Interessanterweise ist Aurora-B in einigen humanen Tumoren überexprimiert, was oft mit einer Überexpression ihres Aktivators INCENP korreliert (Adams et al., 2001b). Es wird diskutiert, dass ein möglicher kanzerogener Effekt von Aurora-B durch Histon H3 Phosphorylierung und/oder die Induktion von Zytokinesedefekten vermittelt ist (Ota et al., 2002; Tatsuka et al., 1998).

In Vertebraten ist neben Aurora-A und -B ein Drittes Aurora Ortholog, die Aurora-C Kinase exprimiert (Bernard et al., 1998). Aurora-C ist spezifisch in Testis, jedoch auch in einigen Tumorzelllinien wie der Cervixkarzinom-Zelllinie HeLa exprimiert. Aurora-C lokalisiert in HeLa Zellen in der Anaphase und Zytokinese an den Centrosomen (Kimura et al., 1999). Die Aurora-C Kinaseaktivität ist ebenfalls über Phosphorylierung reguliert. So ist die Protein-Kinase A (PKA) *in vitro* ein negativer Regulator der *Mus musculus* Aurora-C Kinase (Chen et al., 2003). Man kann spekulieren, ob Aurora-C aufgrund des Expressionsmusters primär an der Organisation meiotischer Prozesse beteiligt ist.

Die humane Aurora-A Kinase, die Gegenstand dieser Arbeit ist und weitere Aurora-A Orthologe, sollen im folgenden Kapitel im Detail diskutiert werden. Die wichtigsten Funktionen der eben diskutierten Aurora Kinasen sind hier nochmals kurz zusammengefasst:

Organismus	Aurora Kinase	Funktion	Substrate/Interaktoren
<i>C. reinhardtii</i>	CALK	Gametenentwicklung	Kinesin II
<i>S.cerevisiae</i>	Ipl1	Kinetochor Spannungssensor Mikrotubuli / Kinetochor Interaktion	Dam1 Komplex Ndc80 Komplex Sli15p, Ndc10p
<i>S.pombe</i>	Ark1	Spindel-Abbau Kinetochor Spannungssensor	Ndc10p (?) Pic1p (INCENP) Bir1p (Survivin)
<i>C.elegans</i> <i>D.melanogaster</i> <i>H. sapiens</i> <i>M.musculus</i>	Aurora-B	Mikrotubuli / Kinetochor Interaktion Zytokinese Chromosomen Kondensation (?)	INCENP Survivin Cenralspindlin Typ III intermediäre Filamente Histon H3 (?)
<i>H. sapiens</i> <i>M.musculus</i>	Aurora-C	Meiose (?)	?

Tab. 1 : Zusammenfassung der wichtigsten Funktionen der Aurora und Aurora-B Kinasen.

Die Aurora-A Protein-Kinase

Aurora-A Homologe Kinasen aus den Spezies *C.elegans* (Air-1), *D.melanogaster* (Aurora), *X.laevis* (Eg2), *M.musculus* (Aik2) und *H.sapiens* (Stk15) sind auf molekularer Ebene näher charakterisiert worden. Alle diese Kinasen zeigen eine zellzyklusabhängige Regulation der Expression, mit maximaler Expression in der Mitose. Ebenso lokalisieren sie ab der G₂-Phase an die Centrosomen und die mitotische Spindel.

Das humane Aurora-A Gen ist auf Chromosom 20q13.31 (Ensembl cytogenetic band) gelegen. Es entspricht einem 22,8 kb genomischen Bereich mit 10 Exonen, welcher ein 2,23 kb Transkript ergibt (GeneCards, RZPD). Das Gen kodiert für ein Protein von 403 Aminosäuren und einem berechneten Molekulargewicht von 47,5 kDa. Die Aurora-A mRNA wird in menschlichen Zellen über den Transkriptionsfaktor E4TF1 induziert und ist zellzyklusabhängig, durch ein CDE/CHR (cell-cycle-dependent element/cell-cycle gene

homology region) Repressorelement reguliert (Tanaka et al., 2002a). Zusätzlich ist möglicherweise alternatives Splicen der 5' untranslatierten Region (UTR) an der Regulation der Expression beteiligt (Shin et al., 2000).

Die Aurora-A Kinase ist komplex reguliert. So spielen Protein-Abbau, posttranslationale Modifikation und Interaktion mit Modulatoren eine wichtige Rolle (Abb. 8). Aurora-A wird am Ende der Mitose über Ubiquitin vermittelten Degradation durch den APC/C^{Cdh1} Komplex abgebaut (Castro et al., 2002a; Honda et al., 2000; Taguchi et al., 2002). Die Ubiquitinierung von Aurora-A ist durch ein neu identifiziertes Degradationselement, die so genannte Aurora-Box (A-Box) („RxLxPSN“ AS 42-53 der humanen Aurora-A) vermittelt (siehe Abb. 7) (Castro et al., 2002b; Littlepage und Ruderman, 2002). Demgegenüber ist die im Aminoterminal der Aurora-A Kinasen enthaltene KEN-Box für die Polyubiquitinierung von Aurora-A nicht essentiell (Arlot-Bonnemains et al., 2001; Taguchi et al., 2002). Die A-Box aktiviert eine carboxyterminal gelegene D-Box, welche für sich selbst nicht ausreichend für den Abbau von Aurora-A ist und wird daher auch als „D-Box activating domain“ (DAD) bezeichnet (Castro et al., 2002b). Der Abbau von Aurora-A wird durch Phosphorylierung der A-Box an einem konservierten Serinrest (S53), eventuell autokatalytisch, reguliert (Haydon et al., 2003; Littlepage et al., 2002; Littlepage und Ruderman, 2002). Hierbei blockiert Phosphorylierung von Serin 53 den Abbau von Aurora-A in *X.laevis* Oozyten-Extrakten (Littlepage und Ruderman, 2002).

Die Regulation des Aurora-A Protein-Abbaus scheint zudem über Wechselwirkung mit Proteinen, wie AIP (Aurora-A Kinase Interacting Protein), welches einen erhöhten Abbau des humanen Aurora-A Proteins bewirkt, reguliert zu sein (Kiat et al., 2002). Obwohl Aurora-A durch den APC/C^{Cdh1} abgebaut wird, ist für die humane Aurora-A auch eine Interaktion mit der APC/C Untereinheit Cdc20 gezeigt (Farruggio et al., 1999). Die exakte biologische Funktion dieser Interaktion ist jedoch nicht bekannt.

Neben dem Proteinspiegel ist auch die enzymatische Aktivität von Aurora-A zellzyklusabhängig reguliert. Autophosphorylierung an einem konservierten Threonin im T-loop von Aurora-A (T288 bei *H.sapiens*), führt zur Aktivierung der Kinase. Diese Stelle ist die wichtigste aktivierende Autophosphorylierungsstelle in Aurora-A (Eyers und Maller, 2003). Ähnlich wie bei Ipl1p in *S.cerevisiae*, wird auch die humane Aurora-A Kinase durch die Proteinphosphatase PP1 an der Aktivierungsstelle T288 dephosphoryliert und hierdurch inaktiviert (Abb. 8) (Walter et al., 2000; Katayama et al., 2001).

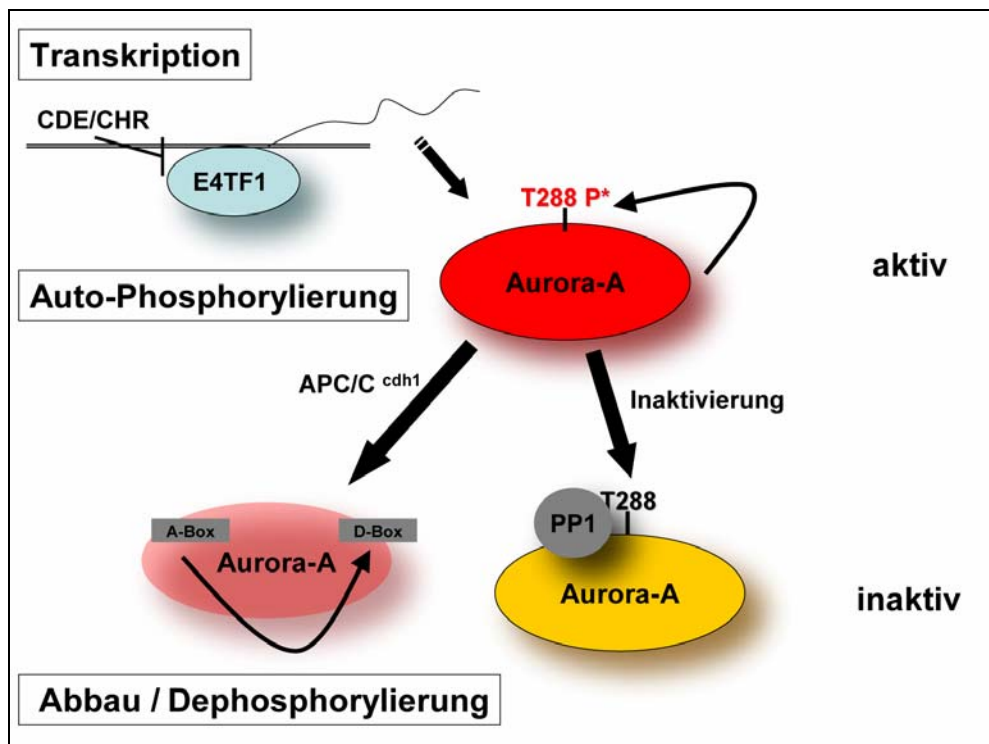


Abb. 8 : Schematische Darstellung der wichtigsten Regulationsmechanismen von Aurora-A.

Dies wird vermittelt durch direkte Bindung von PP1 an zwei konservierte PP1-Bindungsstellen in Aurora-A (AS 162-165 und 343-346) (Katayama et al., 2001). Durch massenspektrometrische Analyse von in meiotischen *X.laevis* Extrakten inkubierter rekombinanter Aurora-A Kinase aus *X.laevis* konnten weitere Phosphorylierungsstellen in Aurora-A ermittelt werden. Hierbei wurde neben der Autoaktivierungsstelle im T-loop (hier T295) und S53 in der A-Box, noch eine weitere Phosphorylierungsstelle an Serin 349, in der katalytischen Domäne der Kinase, identifiziert (Littlepage et al., 2002). Diese Aminosäure ist in rekombinanter *X.laevis* Aurora-A autophosphoryliert (Haydon et al., 2003). Mutation von Serin 394 zu Asparaginsäure, blockiert die Kinaseaktivität, wohingegen die Mutation zu Alanin die Kinaseaktivität nur geringfügig beeinflusst. Dies impliziert, dass dieser Aminosäurerest für die Regulation der Kinase wichtig ist, beziehungsweise eine strukturell empfindliche Stelle darstellt (Littlepage et al., 2002).

Als ein weiterer Regulator der Aurora-A Kinaseaktivität kommt der Cdk1-Cyclin-B Komplex in Betracht. Studien mit CDK Inhibitoren zeigen, dass Cdk1-Cyclin-B, für die Aktivierung der humanen Aurora-A Kinase notwendig sein könnte (Marumoto et al., 2002). In meiotischen Systemen, wie *X.laevis* Oozyten-Extrakten, scheint die Aurora-A

Aktivität und Phosphorylierung ebenfalls von funktioneller Cdk1 abhängig zu sein (Maton et al., 2003). Aurora-A ist jedoch kein direktes Substrat von Cdk1 (Maton et al., 2003; Marumoto et al., 2002). Cdk1 scheint somit die Aktivität von Aurora-A indirekt, eventuell über Inaktivierung von PP1 durch Phosphorylierung zu regulieren (Maton et al., 2003; Marumoto et al., 2002).

Die Kinaseaktivität von Aurora-A kann neben der Regulation durch Phosphorylierung auch durch Wechselwirkung mit Bindungspartnern reguliert werden (Tab. 2). So wurde in einem biochemischen Screen in *X.laevis* das Mikrotubuli-assoziierte Protein TPX2 als Aktivator der *X.laevis* Aurora-A Kinase identifiziert (Eyers et al., 2003). Da auch in anderen Vertebraten TPX2 homologe Proteine vorkommen, könnte TPX2 ein konservierter Regulator der Aurora-A Kinaseaktivität sein. Ferner ist für das humane LIM-Domänen Protein Ajuba, welches im Yeast-Two-Hybrid mit Aurora-A interagiert, beschrieben, dass es die Aktivität der centrosomalen Aurora-A positiv beeinflusst (Hirota et al., 2003). Neben diesen Aktivatoren sind auch Proteine isoliert worden, die Aurora-A durch Bindung inaktivieren. So ist für den Tumorsuppressor p53 eine Bindung an die humane Aurora-A Kinase gezeigt, die zur Hemmung der Kinaseaktivität führt (Chen et al., 2002; Katayama et al., 2004). Eine negative Regulation der Aurora-A Kinaseaktivität ist ebenso für RasGAP gezeigt, welches über seine SH3-Domäne mit Aurora-A interagiert (Gigoux et al., 2002).

Um einen weiteren Einblick in die Regulation von Proteinkinasen zu erhalten, ist die Analyse der Proteinstruktur oft hilfreich. Die Struktur der humanen Aurora-A Kinase-Domäne konnte durch Röntgenstrukturanalyse im autophosphorylierten und im unphosphorylierten Zustand aufgeklärt werden (Bayliss et al., 2003; Cheetham et al., 2002; Nowakowski et al., 2002). Sie zeigt ein klassisches Proteinkinase-Faltungsmuster mit einem β -Faltblatt dominierten aminoterminalen Lobus und einem α -helikalen carboxyterminalen Lobus, die das aktive-Zentrum und den katalytischen Spalt bilden (Abb. 9) (Bayliss et al., 2003; Cheetham et al., 2002; Nowakowski et al., 2002). Aurora-A ist in ihrer Gesamtstruktur den SRC Tyrosin Kinasen und Serin-Threonin-Kinasen der AGC-Familie sehr ähnlich. Aurora-A besitzt jedoch eine spezifische Koordination der katalytische Domäne (Cheetham et al., 2002; Nowakowski et al., 2002).

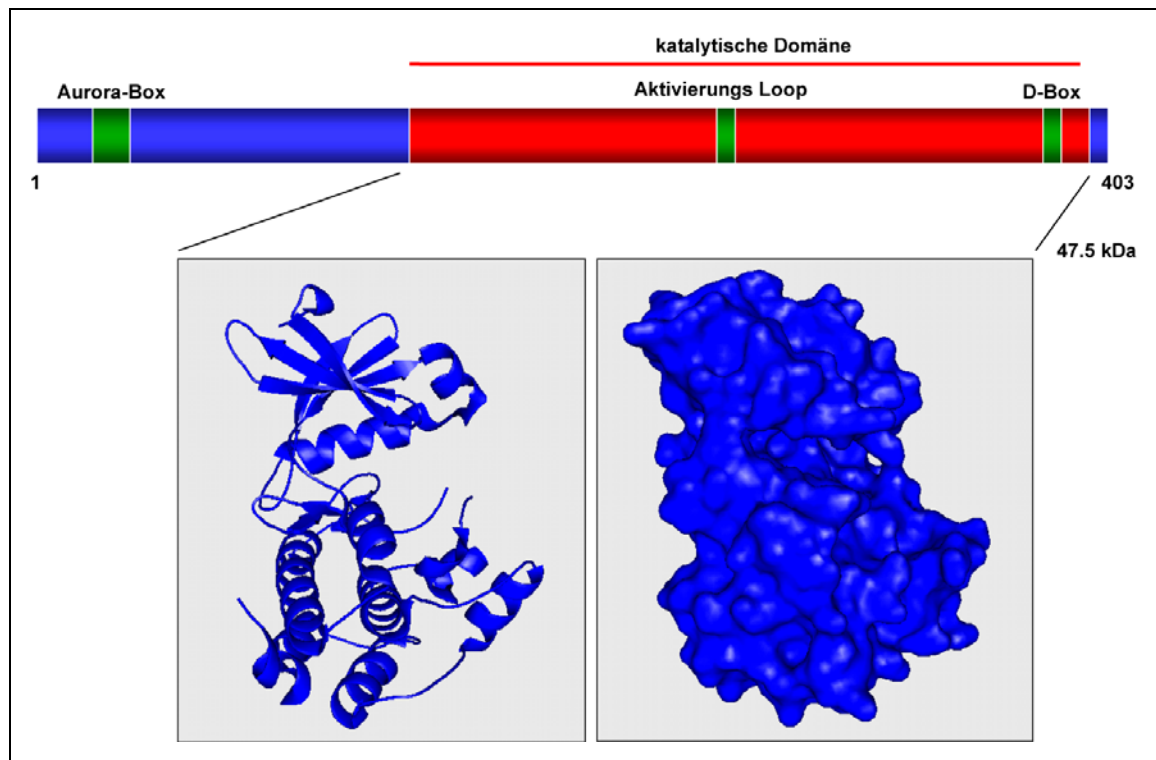


Abb. 9 : Schematischer Aufbau der Aurora-A Kinase und Struktur der katalytischen Domäne.

Die Lage der katalytischen Domäne sowie der A-Box und der D-Box sind dargestellt (oben). Struktur der humanen Aurora-A Kinase-Domäne: Bänderdiagramm der Struktur der katalytischen Domäne (links) und die berechnete molekulare Oberfläche (rechts) sind dargestellt. Verwendete Koordinaten: 1OL7 (PDB). Die Visualisierung wurde mit Pymol generiert und editiert.

Die humane Aurora-A Kinase und die orthologen Kinasen aus *C.elegans*, *D.melanogaster* und *X.laevis* zeigen ein einheitliches Lokalisierungsmuster. Aurora-A lokalisiert in der G₂- und der M-Phase an die Centrosomen, sie dekoriert in der Mitose zusätzlich die Spindel-Mikrotubuli und ist in der Zytokinese neben den Centrosomen auch am Mittelkörper nachzuweisen (Berdnik und Knoblich, 2002; Bischoff et al., 1998; Giet et al., 1999b; Schumacher et al., 1998). Die centrosomale Lokalisation von Aurora-A ist dabei unabhängig von der Kinaseaktivität (Giet und Prigent, 2001; Giet et al., 2002). In menschlichen Zellen ist die Lokalisation von Aurora-A an den Spindelapparat ein dynamischer Prozess, wobei die Austauschrate der centrosomalen Aurora-A mit dem zytoplasmatischen Pool bei nur etwa 3 Sekunden liegt (Stenoien et al., 2003). In *X.laevis* ist die centrosomale Lokalisation von Aurora-A zudem Mikrotubuli-unabhängig (Giet und Prigent, 2001). Studien in *X.laevis* und mit humanen Zellen versuchten zu klären, welche Domäne von Aurora-A für die spezifische centrosomale Lokalisation verantwortlich ist. Für die *X.laevis* Aurora-A Kinase (Eg2) wurde hierbei die divergente aminoternale Domäne (AS 1-138) als centrosomales Lokalisationssignal kartiert (Giet und Prigent, 2001). Demgegenüber wurde für die humanen Aurora-A Kinase eine intermediäre Domäne

(AS 130-310) als Lokalisierungssignal kartiert (Stenoien et al., 2003). Rekombinante Aurora-A aus *X.laevis* bindet *in vitro* kinaseunabhängig direkt an Mikrotubuli (Giet et al., 1999b; Roghi et al., 1998). Interessanterweise lokalisiert überexprimierte humane Aurora-A jedoch nicht an Interphase-Mikrotubuli in der Zelle (Meraldi et al., 2002). Aurora-A scheint daher indirekt über die Bindung an Linkerproteine an Mikrotubuli und die Centrosomen zu lokalisieren. Kandidaten für solche centrosomalen Linkerproteine sind die Aurora-A Bindungspartner Centrosomin (CNN) in *D.melanogaster* sowie das LIM-Domänen Protein Ajuba und eventuell das Tumorsupressorprotein NM23-H1 in humanen Zellen (Hirota et al., 2003; Terada et al., 2003; Du und Hannon, 2002). Wie Aurora-A an die Spindel-Mikrotubuli lokalisiert, ist nicht im Detail bekannt.

Aurora-A ist ein wichtiger Regulator der mitotischen Spindel und der Centrosomen (Dutertre et al., 2002). So sind viele der bisher identifizierten Bindungspartner und Substrate von Aurora-A Spindelproteine (Tab. 2) (Dutertre et al., 2002). In *X.laevis* ist Aurora-A essentiell für den Aufbau einer bipolaren mitotischen Spindel, wie durch Antikörperinjektions-Experimente in Oozyten-Extrakten gezeigt ist (Giet und Prigent, 2000). Für die Bildung der mitotischen Spindel ist hier die Kinaseaktivität von Aurora-A verantwortlich, da Injektion katalytisch inaktiver Kinase dominant negativ wirkt und zur Bildung monopolarer Spindeln führt (Giet et al., 1999b; Roghi et al., 1998). Ein ähnlicher Phänotyp ist für einige Mutanten der *D.melanogaster* Aurora-A beschrieben, die ebenfalls monopolare Spindeln formen (Glover et al., 1995). Antikörper-Zugabe zu *X.laevis* Oozyten-Extrakten führt zur Auflösung bereits assemblierter bipolarer Spindeln in Astern, ein Phänotyp, der dem der Inhibition des Spindelmotors Eg5 entspricht (Giet und Prigent, 2000; Mayer et al., 1999). Interessanterweise ist Eg5 ein Bindungspartner und Substrat der *X.laevis* Aurora-A Kinase (Giet et al., 1999a). Dies legt nahe, dass die Funktion von Aurora-A über Phosphorylierung von Spindelkomponenten, wie Eg5, vermittelt wird. Im meiotischen Modellsystem *X.laevis* ist Aurora-A somit essentiell für den Aufbau des Spindelapparates.

Im Nematoden *C.elegans* führt die Depletion der Aurora-A Kinase (AIR-1) durch RNAi zu fehlerhaften bipolaren mitotischen Spindeln mit einer geringeren Mikrotubuli Dichte (Schumacher et al., 1998). Detaillierte Untersuchungen von Aurora-A depletierten Embryonen zeigen, dass dies auf einen Fehler im Prozess der Centrosomen-Reifung zurückzuführen ist. Dies äußert sich dadurch, dass die perizentriolären Proteine γ -Tubulin, Zyg-9 (XMAP215 Homolog) und CeGip (eine Komponente des γ -TuRC) nicht mehr an die Centrosomen rekrutiert werden können (Hannak et al., 2001). Weitere Details der

Funktion von Aurora-A im Spindel-Aufbau-Prozess konnten durch RNAi Experimente in *D.melanogaster* aufgeklärt werden. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass Aurora-A mit dem centrosomalen Protein Centrosomin (CNN) interagiert, wobei die CNN Lokalisation abhängig von Aurora-A ist. CNN rekrutiert seinerseits γ -Tubulin an die Centrosomen und reguliert so die Centrosomen-Reifung (Berdnik und Knoblich, 2002; Terada et al., 2003). In *D.melanogaster* ist ferner auch die Regulation der Mikrotubuli-Dynamik an den Centrosomen durch Aurora-A koordiniert. Dies wird über die Rekrutierung und Phosphorylierung von d-TACC und seinem Bindungspartner, dem Mikrotubuli stabilisierenden Protein Msps (ein Homolog zu XMAP215), vermittelt (Giet et al., 2002). Depletion von Aurora-A führt daher zu verkürzten astralen Mikrotubuli und zur Fehllokalisation von d-TACC (Giet et al., 2002). Es wurde hierauf ein interessantes Modell vorgeschlagen, wonach die Aurora-A abhängige Rekrutierung von d-TACC, die Interaktion von Msps mit Mikrotubuli-Minusenden stabilisiert und so zur Stabilisierung der Mikrotubuli führt (Lee et al., 2001). Es gibt auch in humanen Zellen Homologe zu d-TACC. Humanes TACC3 ist ebenfalls ein Substrat und Bindungspartner von Aurora-A (Gergely, 2002; Tien et al., 2003; Giet et al., 2002). Dies deutet an, dass d-TACC Homologe Proteine weitere wichtige Ziele der Aurora-A Regulation an den Centrosomen sind (Gergely, 2002).

Genetische Analysen in *D.melanogaster* legen nahe, dass Aurora-A ebenfalls an der Centrosomen-Teilung beteiligt ist (Glover et al., 1995). So sind Spindelpole ohne Centrosomen nach Aurora-A Depletion durch RNAi, beziehungsweise bei einigen Aurora-A Mutanten in *D.melanogaster* Zellen, zu beobachten (Glover et al., 1995; Giet et al., 2002). Auch in humanen Zellkulturen sind nach der Überexpression von Aurora-A multiple Centrosomen zu beobachten. Dies führte zu dem Schluss, dass Aurora-A ein Regulator der Centrosomen-Teilung und der Centrosomen-Duplikation ist (Zhou et al., 1998). Befunde aus *C.elegans* und humanen Zellen zeigen jedoch, dass Aurora-A nicht in allen Spezies an der Centrosomen-Teilung beziehungsweise –Duplikation beteiligt ist und die detaillierte Untersuchung des Überexpressionsphenotyps in humanen Zellen konnte klären, dass die beobachteten multiplen Centrosomen wahrscheinlich das Ergebnis von Zytokinesedefekten sind (Meraldi et al., 2002; Schumacher et al., 1998). Ob Aurora-A Kinaseaktivität für diesen Prozess notwendig ist, wird derzeit kontrovers diskutiert, könnte aber abhängig vom verwendeten Modell-System und dem Expressionsniveau der Kinase sein (Eyers und Maller, 2003; Littlepage und Ruderman, 2002; Anand et al., 2003; Meraldi et al., 2002).

Protein	Substrat	Bindung	Assay	Literatur
AIP1		Inhibitor	Y2H	Kiat et al., 2002
Ajuba	x	Aktivator	Y2H,colP	Hirota et al., 2003
Cdc20		x	Y2H	Farruggio et al., 1999
CNN		x	colP	Terada et al., 2003
CPEB	x			Huang et al., 2002 Mendez et al., 2000
dTACC TACC3	x	x	colP	Giet et al., 2002 Tien et al., 2003
Eg5	x	x	colP	Giet et al., 1999a
MBD3	x	x	colP	Sakai et al., 2002
NM23-H1		x	Y2H,colP	Du und Hannon, 2002
p53	x	Inhibitor (A-Box binding)	Y2H, colP	Chen et al., 2002 Katayama et al., 2004
RasGAP		Inhibitor	Y2H	Gigoux et al., 2002
TACC1		?	colP	Conte et al., 2003
TPX2	x	Aktivator	colP	Diese Arbeit Eyers et al., 2003 Tsai et al., 2003

Tab. 2 : Substrate und Bindungspartner von Aurora-A.

colP: Co-Immunpräzipitation, Y2H: Yeast-Two-Hybrid Screen.

Wie oben diskutiert, ist Aurora-A ein wichtiger Regulator des mitotischen Spindelapparates. Aurora-A ist jedoch auch in der Regulation der frühen Entwicklung von Vertebraten involviert. So wurde die *X.laevis* Aurora-A Kinase Eg2 ursprünglich in einem Screen für mRNAs, die in der frühen Entwicklung reguliert werden, identifiziert (Paris und Philippe, 1990). Es konnte gezeigt werden, dass Aurora-A ein wichtiges Element der Progesteron abhängigen Oozyten-Reifung ist (Frank-Vaillant et al., 2000). Diese Funktion von Aurora-A wird hauptsächlich durch die Phosphorylierung des mRNA bindenden Proteins CPEB und die hierdurch bedingte Polyadenylierung und Translation von gespeicherten mRNAs, wie c-mos, vermittelt (Mendez et al., 2000). Dies führt in der Folge zur Aktivierung der ERK/MAPK Kaskade und zur Reifung der Oozyten (Mendez et al., 2000). Eine ähnliche Aurora-A abhängige Regulation der Translation ist auch für Maus Oozyten berichtet (Hodgman et al., 2001). Aurora-A ist in Maus-Oozyten zudem maximal in der Metaphase der Meiose II exprimiert und ist ein kritischer Regulator der meiotischen Spindel (Yao et al., 2003). Aurora-A ist in *X.laevis* ferner am Ausstoßen des Polarkörpers beteiligt und reguliert den Meiose I-II Übergang (Castro et al., 2003). Da bei diesem Prozess auch das Aurora-A Substrat Eg5 eine Rolle spielt, scheint Aurora-A diesen

Vorgang über die Phosphorylierung von Eg5 zu vermitteln (Castro et al., 2003). Aurora-A ist in *X.laevis* und eventuell weiteren Vertebraten somit ein zentraler Regulator der Oozyten Reifung. Das humane CPEB Protein, welches im Menschen in Neuronen exprimiert wird, wird ebenfalls von Aurora-A phosphoryliert (Huang et al., 2002). Es wurde daher vorgeschlagen, dass Aurora-A ferner die Plastizität von Synapsen modulieren könnte (Huang et al., 2002).

Aurora-A als Proto-Onkogen

Schon 1914 erkannte Theodor Boveri, dass maligne Entartung und das resultierende Krankheitsbild Krebs ein „Zellproblem“ ist (Boveri, 1914). Er postulierte, dass numerische Aberrationen des Chromosomensatzes (Aneuploidien) zu maligner Entartung führen können (Boveri, 1914). In der Tat sind Aneuploidien charakteristisch für die meisten humanen Tumoren. Aneuploidien sind zudem oft hoch variabel und führen zu chromosomaler Instabilität (CIN) (Rajagopalan et al., 2003; Lengauer et al., 1998). Ein hierdurch bedingter Verlust von Tumorsuppressorgenen beziehungsweise Zugewinn von Proto-Onkogenen kann maligne Entartung fördern (Hanahan und Weinberg, 2000). Eine mögliche Ursache für eine solche Fehlsegregation des Erbmaterials sind multipolare mitotische Spindeln, wie sie beim Vorhandensein von mehr als zwei Centrosomen beziehungsweise von zusätzlichen acentriolären Spindelpolen in der Mitose auftreten können (Abb. 10). Diese ebenfalls von Theodor Boveri vorgeschlagene Hypothese gewinnt heute wieder an Bedeutung (Nigg, 2002; Boveri, 1914).

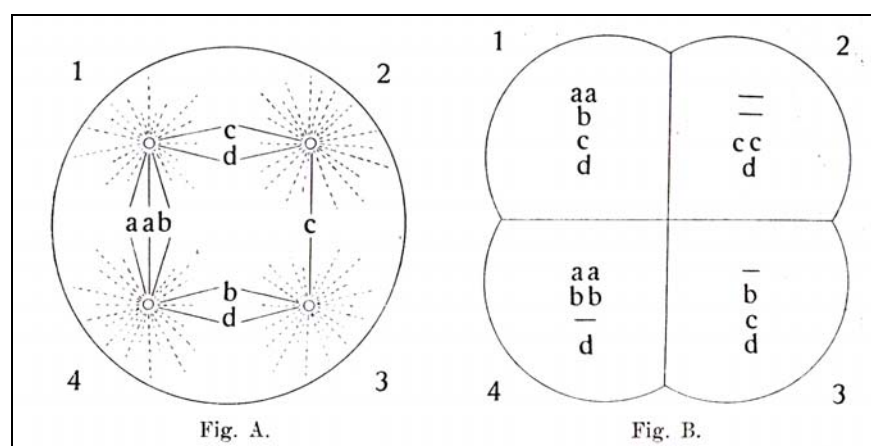


Abb. 10 : Mutipolare Spindeln können zu Aneuploidien führen.

Ein diploider Chromosomensatz ist durch die Buchstaben a,b,c und d dargestellt. Nach Ausbildung einer tetrapolaren Spindel würde bei einer Anordnung der Chromosomen wie in Fig.A gezeigt, eine Verteilung der Chromatide wie in Fig.B resultieren, wenn Zytokinese zwischen allen Polen der Spindel erfolgt. (aus Boveri, 1914).

Detaillierte Untersuchungen zeigen, dass Zellen mit mehr als zwei Centrosomen in einer Vielzahl von humanen Tumoren vorkommen und dies ein frühes Ereignis in der malignen Progression darstellt (Goepfert et al., 2002; Pihan et al., 2003; D'Assoro et al., 2002). In Brustkrebs und Colonkarzinomen konnte ferner eine positive Korrelation, zwischen der Centrosomenanzahl und Aneuploidien gezeigt werden (Ghadimi et al., 2000; Lingle et al., 2002). Es konnte bisher jedoch nicht zweifelsfrei geklärt werden, ob Centrosomen-Anomalien nicht eventuell ein Folgeprodukt maligner Entartung darstellen (Nigg, 2002).

Numerische Centrosomen Abberationen gehen häufig mit einer veränderten Morphologie und Lage der Centrosomen in der Zelle einher (Lingle und Salisbury, 1999). So sind oft eine erhöhte Größe der Centrosomen, die Formation von acentriolären Körpern und ein veränderter Phosphorylierungsstatus von PCM Komponenten zu beobachten. Da die Überexpression von PCM Proteinen, wie TACC, Pericentrin oder C-Nap1 in humanen Zellen zu Spindeldefekten führt, könnten die in Tumor-Zellen beobachteten Veränderungen von PCM Komponenten, chromosomale Instabilität zusätzlich zu fördern (Gergely et al., 2000; Mayor et al., 2002; Purohit et al., 1999).

Für die humane Aurora-A Kinase ist gezeigt worden, dass sie in der Regulation der Centrosomen involviert ist. So führt Überexpression von Aurora-A zu multiplen Centrosomen (Zhou et al., 1998; Meraldi et al., 2002). Aurora-A könnte somit multiple Spindeln induzieren und so zu maligner Entartung der Zelle, wie oben beschrieben, führen. In der Tat ist Aurora-A mit maligner Entartung assoziiert. So wurde Aurora-A ursprünglich als ein Gen identifiziert, das in einer in humanem Brustkrebs häufig amplifizierten genomischen Region auf Chromosom 20 (20q13.2) liegt (Tanner et al., 1994; Tanner et al., 1995). Die klonierte cDNA ist ursprünglich entsprechend als „Breast Tumour Activated Kinase“ (BTAK) publiziert worden (Sen et al., 1997). Für eine Vielzahl humaner Tumoren und Tumorzelllinien aus verschiedenen Geweben konnte experimentell bestätigt werden, dass das Aurora-A Gen amplifiziert, beziehungsweise die Kinase überhöht exprimiert ist (Tab. 3). Dies zeigt, dass die ursprünglich in Brustkrebs beobachtete Amplifikation von Aurora-A nicht auf diese Krebsart beschränkt ist.

Erhöhte Expression der Kinase im Gewebe ist mit erhöhter Kinaseaktivität korreliert (Gritsko et al., 2003). Die Überexpression von Aurora-A führt *in vitro* zu neoplastischer Transformation von NIH3T3 Fibroblasten und Rat1 Zellen (Zhou et al., 1998; Bischoff et al., 1998). Es ist ferner gezeigt worden, dass Überexpression von Aurora-A in NIH3T3 Maus-Fibroblasten auch Tumore in Nackt-Mäusen induzieren kann

(Bischoff et al., 1998). Dass *X.laevis* Aurora-A ebenfalls NIH3T3 Zellen transformieren kann und Tumore in Nackt-Mäusen induziert, bestätigt die onkogene Eigenschaft der Aurora-A Kinasen (Littlepage et al., 2002).

Tumor	Aurora-A	Material	Publikation
Brustkrebs	amplifiziert	Patienten Proben	Miyoshi et al., 2001; Sen et al., 1997; Tanaka et al., 1999
Colon-Karzinom	amplifiziert	Patienten Proben Zelllinien	Bischoff et al., 1998; Zhou et al., 1998
Harnblasen Tumoren	amplifiziert	Patienten Proben	Sen et al., 2002
Magen-Karzinome	amplifiziert überexprimiert	Patienten Proben	Sakakura et al., 2001
Nierenzell-Karzinom	stärkere Immunfärbung	Patienten Proben	Ehara et al., 2003
Non-Hodgkin-Lymphom	amplifiziert	Zelllinien	Hamada et al., 2003
Ovar-Karzinom	überexprimiert erhöhte Aktivität	Patienten Proben	Gritsko et al., 2003
Pankreas Tumoren	amplifiziert	Zelllinien Patienten Proben	Li et al., 2003
Prostata-Karzinom	amplifiziert	Xenograft Tumor	Bar-Shira et al., 2002

Tab. 3 : Aurora-A Status in ausgewählten humanen Tumoren.

In Zellkulturen induziert die Überexpression von Aurora-A Polyploidien, ausgelöst durch Zytokinesedefekte (Littlepage und Ruderman, 2002; Anand et al., 2003; Meraldi et al., 2002). Wohingegen für diese Polyploidisierung von Zelllinien die Kinaseaktivität nicht zwingend notwendig ist, scheint diese für die neoplastische Transformation von Zellen *in situ* essentiell zu sein (Zhou et al., 1998; Bischoff et al., 1998; Meraldi et al., 2002; Littlepage und Ruderman, 2002). Es wird diskutiert, dass Aurora-A induzierte Polyploidisierung auch in humanen Tumoren eine Rolle spielt. So konnte gezeigt werden, dass erhöhte Aurora-A Expression und damit einhergehende erhöhte Kinaseaktivität, in direktem Zusammenhang mit erhöhter chromosomaler Instabilität (CIN), Aneuploidie und damit schlechter medizinischer Prognose stehen (Sakakura et al., 2001; Zhou et al., 1998; Miyoshi et al., 2001; Hamada et al., 2003). Dass Aurora-A wichtig für den Prozess der Zell-Transformation ist, zeigt ferner die Aufhebung des transformierenden Phänotyps von Tumorzellen (MDA-435) durch die Inhibition der Aurora-A Überexpression durch Antisense-Konstrukte (Katayama et al., 2003). Eine vor kurzem abgeschlossene genetische Studie, in der Aurora-A als Hautkrebs-Anfälligkeitssgen der Maus identifiziert wurde, bestätigt Aurora-A zweifelsfrei als ein Proto-Onkogen (Ewart-Toland et al., 2003). Diese Studie charakterisierte auch die humane Aurora-A Kinase und zeigte, dass ein

Polymorphismus in der humanen Aurora-A (F31I) mit erhöhtem Krebsrisiko assoziiert zu sein scheint (Ewart-Toland et al., 2003).

Es stellt sich somit die Frage, wie Aurora-A funktionell als Onkogen wirkt. Das Auftreten von polyploiden humanen Zellen mit supernumerischen Centrosomen nach Überexpression von Aurora-A ist abhängig vom p53 Status der Zelle (Meraldi et al., 2002). Der Verlust von funktionellem p53 ist hierbei für das Überleben von Zellen mit Zytokinesedefekten wichtig, da Zellen mit solchen Defekten sonst arretieren oder absterben. Dies ist zu erklären mit dem Verlust eines p53 abhängigen „Tetraploidy-Checkpoints“ in der G₁-Phase (Cross et al., 1995), wodurch die Zellen nach Zytokinesedefekten, wie sie durch die Überexpression von Aurora-A induziert werden, im Zellzyklus fortfahren können. Diese Zellen können wieder in die S-Phase eintreten und ihren Centrosomensatz verdoppeln, was so zu den beobachteten supernumerischen Centrosomen führt (Borel et al., 2002; Meraldi et al., 2002).

Ein alternatives Modell für die p53 abhängige Suppression von Aurora-A induzierter Centrosomen-Amplifikation wurde von Chen und Mitarbeitern aufgestellt. Sie identifizierten p53 als Bindungspartner der aminoterminalen Aurora-Box von Aurora-A und konnten zeigen, dass p53 die transformierende Eigenschaft von Aurora-A in NIH3T3 Zellen inhibiert (Chen et al., 2002). Über *in vitro* Versuche kommen sie zu dem Schluss, dass dies durch negative Beeinflussung der Kinaseaktivität von Aurora-A durch die p53 Bindung bedingt ist (Chen et al., 2002). Demgegenüber wurde kürzlich gezeigt, dass Aurora-A *vice versa* p53 über Phosphorylierung reguliert, indem Phosphorylierung von p53 durch Aurora-A dieses Protein für den Proteasom-abhängigen Abbau über Mdm2 markiert (Katayama et al., 2004). Dies wird bestätigt durch Überexpression von Aurora-A, die *in vivo* mit niedrigen p53 Spiegel in Zellen korreliert (Katayama et al., 2004). Dieser Mechanismus könnte die malignen Eigenschaften von Aurora-A Überexpression zusätzlich verstärken. Dies und die Tatsache, dass Aurora-A Überexpression nicht jede beliebige Zelllinie zu transformieren vermag, belegen, dass Defekte in weiteren Genprodukten notwendig sind, um die Zelle zu transformieren. Wie Aurora-A daher im direkten beziehungsweise indirekten Zusammenhang mit der Entstehung maligner Tumore steht, werden weiterführende Studien zeigen.

Aurora-A ist möglicherweise auch in der Kontrolle des Spindel-Checkpoints involviert. So ist die Reaktion von Zellen auf die Spindelgifte Taxol und Nocodazol gestört, wenn diese Aurora-A überexprimieren (Anand et al., 2003; Jiang et al., 2003). Dies zeigt, dass Aurora-A Überexpression zur Unterdrückung des Spindel Checkpoint-

Signals führen könnte (Anand et al., 2003; Jiang et al., 2003). Ein interessantes Modell, wie dies funktionieren könnte, ist die Annahme einer Kompetition von Aurora-A und BubR1 um Cdc20 Bindung (Farruggio et al., 1999; Jiang et al., 2003). Aurora-A könnte somit eine Erklärung liefern, warum in humanen Tumoren oft Defekte im Spindel-Checkpoint zu erkennen sind, jedoch keine Mutationen in den Checkpoint Genen gefunden werden (Takahashi et al., 1999).

Zusammenfassend lässt sich, aufbauend auf den Daten von Meraldi et al. (2002) folgendes, derzeit sehr provokatives Modell für die Funktion von Aurora-A in maligner Entartung aufstellen: Erhöhte Expression von Aurora-A, hervorgerufen durch genomische Amplifikation, oder Fehlregulation, führt zu erhöhter Aurora-A Kinaseaktivität in der Zelle. Dies bedingt über einen, noch unbekannten, Signalweg Fehler in der Zytokinese. Falls die betroffenen Zellen kein funktionelles p53 mehr exprimieren, wie dies für viele Krebszellen zutrifft, wird so der Eintritt der aberranten tetraploiden Zellen in die nächste S-Phase ermöglicht. Der Centrosomensatz dieser Zellen wird verdoppelt, was zu den beobachteten Centrosomen-Amplifikationen führt. In der folgenden Mitose kann es nun durch die Ausbildung multipolarer Spindeln und weitere Zytokinesedefekte zur Bildung von aneuploiden Zellen und in der Folge zur neoplastischen Transformation der Zellen kommen (Meraldi et al., 2002).

Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch die molekulare Charakterisierung der humanen Aurora-A Kinase sowie die Identifikation neuer Bindungspartner und Substrate ein tieferes Verständnis der zellulären Funktionsweise dieser Kinase zu erlangen. Hierfür wurde rekombinante Aurora-A Kinase erzeugt und charakterisiert. Die Suche nach Interaktionspartnern wurde im Hefe Two-Hybrid-Screen, über Co-Immunpräzipitationen mit einem Aurora-A spezifischen Antikörper und durch Bindungsexperimente mit rekombinanten Protein durchgeführt. Detaillierte Überprüfung und Charakterisierung der gefunden Kandidaten sollte ihr Zusammenspiel mit Aurora-A aufzeigen. Zudem sollte es möglich sein, die Funktion von Aurora-A über die Identifizierung von bereits charakterisierten Proteinen als Aurora-A Bindungspartnern, besser in etablierte Signaltransduktionswege einzugliedern. Ein weiterer Teilaspekt war die Analyse der Aktivierung der humanen Aurora-A durch Phosphorylierung und Protein-Protein-Wechselwirkungen.

Ergebnisse

Charakterisierung der humanen Aurora-A Kinase

Um Aurora-A zu charakterisieren und ihre Regulation durch reversible Phosphorylierung näher untersuchen zu können, wurde humane Aurora-A als rekombinantes Protein aus *Spodoptera frugiperda* Insektenzellen (Sf9) und *Escherichia coli* Bakterien aufgereinigt. Die klonierte Kinase wurde zudem in humanen Zelllinien exprimiert. Neben der WT Kinase wurde hierfür eine Mutante, welche katalytisch inaktiv ist, verwendet. Eine entsprechende Mutante der humanen Aurora-A, die eine Punktmutation in der ATP-Bindungsregion (P-Loop) (Hanks et al., 1988; Saraste et al., 1990) enthält, wurde bereits von Bischoff und Mitarbeitern (1998) beschrieben. Diese Mutation hat zur Folge, dass eine Ionenpaar-Bindung in der Tertiärstruktur unterbleibt, was zur Folge hat, dass ATP nicht mehr hydrolysiert werden kann (Johnson et al., 1996). Für diese Arbeit wurde daher ebenfalls eine Punkt-Mutation in Lysin 162 der ATP-Bindungsregion der Kinase eingeführt (K162R), die im Folgenden als „Kinase Dead“ (KD) bezeichnet wird.

Rekombinante Aurora-A Kinase aus Sf9 Zellen

Um Aurora-A als rekombinantes Protein in einem eukaryotischen System exprimieren zu können, wurde das Baculovirus Expressions-System verwendet. Hierzu wurden rekombinante Baculoviren erzeugt, welche die WT und KD Form der humanen Aurora-A Kinase in infizierten Zellen exprimieren.

Für die Aufreinigung der Kinase wurde diese als aminoterminales GST-Fusionsprotein exprimiert, das zusätzlich eine Schnittstelle für die PreScission-Protease zwischen dem GST-tag und dem Aurora-A Teil des Proteins enthielt. Die Isolierung der Aurora-A Kinase erfolgte entweder als an Glutathion-Sepharose gebundenes oder als eluiertes GST-Fusionsprotein. Alternativ wurde der GST-Teil durch PreScission-Protease Behandlung von der Kinase abgespalten, um unmarkiertes Protein zu erhalten. Die Ausbeute an rekombinantem Protein war im Falle der aktiven Kinase stets geringer als im Vergleich zur inaktiven Form. Behandlung der Insektenzellen mit dem PP1 spezifischen

Phosphataseinhibitor Ocadaic-Acid (OA) führte zu einer Retardierung des WT Proteins im Gel (Abb. 11). Eine solche Änderung der elektrophoretischen Mobilität konnte nur für die WT-Form der Kinase und nicht für die KD-Form beobachtet werden, was für eine Auto-Phosphorylierung als Ursache dieser Retardierung spricht (Abb. 11).

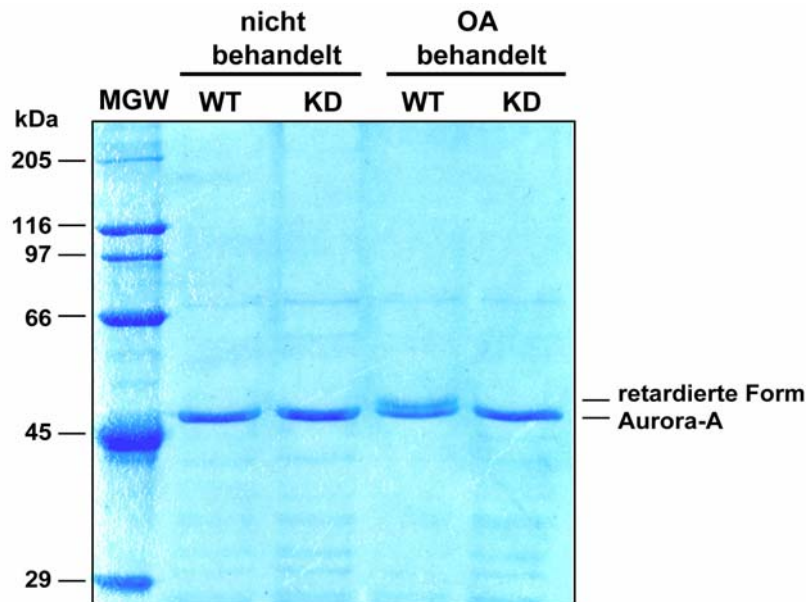


Abb. 11 : Aufreinigung rekombinanter Aurora-A aus Sf9 Zellen.

Rekombinante Aurora-A WT und KD wurde aus Sf9 Insektenzellen aufgereinigt. Coomassie BB gefärbtes SDS-PAGE Gel mit den über Glutathion-Sepharose aufgereinigten und mit Precision-Protease behandelten Proteinen. Um PP1 in den Zellen zu inhibieren, wurden diese vor Lyse für 20 Minuten mit Ocadaic-Acid behandelt. Die Änderung in der elektrophoretischen Mobilität des WT Proteins aus mit Ocadaic-Acid behandelten Zellen ist dargestellt.

Um die Funktionalität der so erhaltenen Enzyme zu testen, wurden *in vitro* Kinaseassays durchgeführt. Da Aurora-A die Modellsubstrate Myelin-basisches-Protein (MBP) (Bischoff et al., 1998; Zhou et al., 1998), Histon H3 (Marumoto et al., 2002), Casein (Zhou et al., 1998) sowie in *X.laevis* den Spindelmotor Eg5 (Giet et al., 1999a) phosphoryliert, wurden diese Proteine als Modellsubstrate getestet. Für die Kinaseassays wurde die Kinase mit einem molaren Überschuss an Substrat und $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ inkubiert. Die aus Sf9 Zellen isolierte Aurora-A Kinase (ohne GST) phosphorylierte die Substrate MBP und Casein sehr gut, sowie Histon H3 geringfügig (Abb. 12A). Histon H1 konnte hingegen, wie berichtet, nicht phosphoryliert werden (Abb. 12A) (Zhou et al., 1998). Mit der KD Mutante erfolgte keine nennenswerte Phosphorylierung der verwendeten Substrate, was bestätigte, dass die gewählte Mutation die Kinase inaktivierte und keine verunreinigende Kinaseaktivität mit aufgereinigt wurde (Abb. 12A). Obwohl *X.laevis*

Aurora-A (Eg2) den Spindelmotor Eg5 *in vivo* und *in vitro* phosphoryliert (Giet et al., 1999a), konnte hier nicht nachgewiesen werden, dass in *E.coli* exprimierte humanes Eg5 von der humanen Aurora-A Kinase nennenswert phosphoryliert wurde (Abb. 12A). MBP wurde daher als exogenes Substrat für die weiteren Kinaseassays gewählt.

Die Aktivität der an Matrix gebundenen rekombinanten Aurora-A war wesentlich höher als die des eluierten GST-Proteins (Abb. 12B). Für die Aurora-A Kinase ohne GST verhielt sich dies ebenso (Abb. 12B). Die Kinaseaktivität der an Matrix gebundenen Aurora-A wurde ferner durch Inkubation vor Beginn des Kinaseassays für eine Stunde bei höheren Temperaturen inhibiert (Abb. 12C).

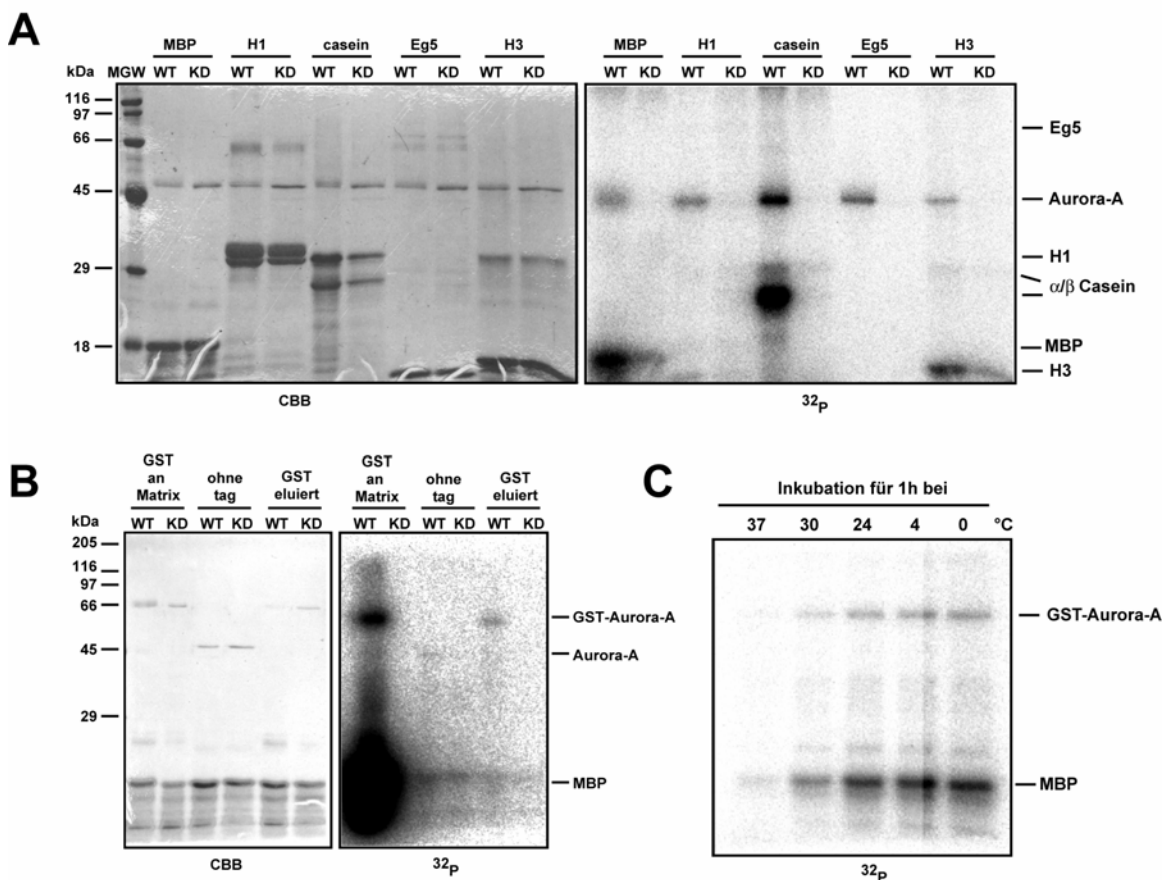


Abb. 12 : Kinaseaktivität rekombinanter Aurora-A aus Sf9 Zellen.

In vitro Kinaseassays mit aus Sf9 Zellen aufgereinigtem, rekombinanten Aurora-A WT und KD Protein in Gegenwart von $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$.

(A) Test der Proteine MBP, Casein, Histon H1, H3 und Eg5 als Substrate von Aurora-A. CBB gefärbtes Gel (links) und Autoradiogramm (rechts) sind gezeigt.

(B) Coomassie BB Gel (links) und das Autoradiogramm (rechts) eines Kinaseassays mit vergleichbaren Mengen an rekombinanter Aurora-A, mit und ohne GST-Tag beziehungsweise an Matrix (Glutathion Sepharose) gebunden. Als Substrat wurde MBP verwendet.

(C) Gleiche Mengen an rekombinanter GST-Aurora-A gebunden an Matrix wurden mit MBP inkubiert. Die Kinase wurde zuvor für eine Stunde bei der angegebenen Temperatur inkubiert. Das Autoradiogramm ist gezeigt.

Dieser Aktivitätsverlust durch die Inkubation konnte durch die Phosphataseinhibitoren β -Glycerolphosphat, Natriumfluorid und Natriumvanadat in Kombination, beziehungsweise Ocadaic-Acid und Microcystin-LR alleine bis zu 70 % reduziert werden (Daten nicht gezeigt). Da nach Inkubation bei höheren Temperaturen die Menge an Aurora-A Protein im Gel nicht verändert erschien, deutete dies darauf hin, dass es sich hierbei nicht um ein Problem von Protein-Abbau handelte. Zugabe von Proteaseinhibitoren beziehungsweise bovinem Serumalbumin (BSA) zeigte ebenfalls keinen Einfluss auf die Reduktion der Kinaseaktivität (Daten nicht gezeigt). Aus diesen Beobachtungen kann geschlossen werden, dass eine kontaminierende inhibitorische Aktivität aus den Insektenzellen mit aufgereinigt wurde. Da die Aurora-A Aktivität über die PP1 Phosphatase negativ reguliert wird (Walter et al., 2000), war es plausibel, dass es sich bei dieser Kontamination um PP1 aus Sf9 Zellen handelte, da zudem die mit dem PP1 spezifischen Inhibitor Ocadaic-Acid behandelte Kinase eine geringfügig höhere Aktivität zeigte (Daten nicht gezeigt).

Bakteriell exprimierte rekombinante Aurora-A Kinase

Um Aurora-A aus einem Organismus aufreinigen zu können, der nicht über mögliche Aurora-A Regulatoren wie PP1 verfügt, wurden Konstrukte für die bakterielle Expression in *E.coli* kloniert. Aurora-A WT und KD wurden als carboxyterminale his-Fusionsproteine in *E.coli* exprimiert und aufgereinigt, da WT Aurora-A nicht als aminoterminal his-Fusionsprotein exprimiert werden konnte (Abb. 13A, Daten nicht gezeigt). Bei der Aufreinigung der WT Kinase waren stets zwei Proteine von etwa 70 und 25 kDa als Verunreinigung zu erkennen, die jedoch nicht mit der KD Form auftraten (Abb. 13A). Eventuell handelt es sich hierbei um Chaperone der hsp-Familie. Wie im Falle der aus Insektenzellen aufgereinigten, OA behandelten Aurora-A, zeigte die aus *E.coli* aufgereinigte Aurora-A Kinase einen deutlichen Unterschied in der elektrophoretischen Mobilität zwischen der WT und der KD Form (Abb. 13A). Behandlung der Kinase mit rekombinanter PP1 führte zur Aufhebung der Retardierung des WT Proteins in der SDS-PAGE, zu geringerer Autophosphorylierung und zur Inaktivierung der Kinase (Abb. 13B). Als Kontrolle wurde PP1 durch den Phosphataseinhibitor Microcystin-LR inhibiert (Abb. 13B). Dies bestätigte, dass PP1 Behandlung die Aurora-A Kinase inaktiviert und Autophosphorylierung mit der Kinaseaktivität korreliert (Walter et al., 2000).

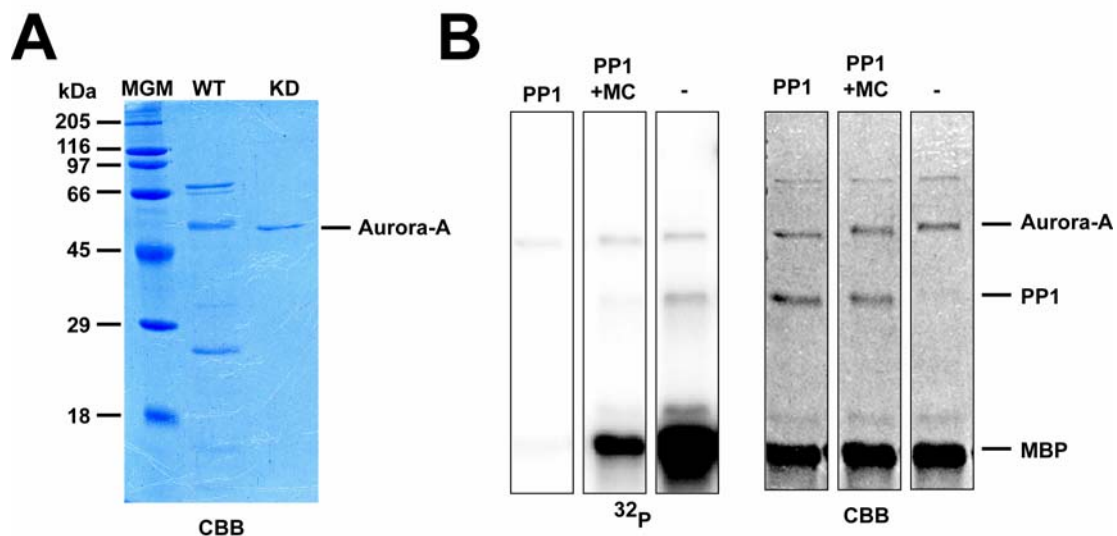


Abb. 13 : Rekombinante Aurora-A-his aus *E.coli*.

(A) Coomassie BB gefärbtes Gel einer Aufreinigung von Aurora-A-his WT und KD aus *E.coli*. Die Größe von Aurora-A ist angegeben. Zusätzliche Banden stellen Verunreinigungen dar.

(B) Kinaseassay mit Aurora-A-his. Aufgereinigtes Protein wurde in Gegenwart von $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ zusammen mit MBP inkubiert. Aurora-A wurde zuvor durch Zugabe von rekombinanter PP1 für 30 Minuten bei 30 °C inaktiviert. Als Kontrolle wurde PP1 durch Microcystin-LR (MC) inhibiert. Ebenso wurde MC den Kinaseassays zugegeben.

Intramolekulare Regulation von Aurora-A

Aus dem zuvor Dargestellten geht hervor, dass die rekombinante Aurora-A Kinase autophosphoryliert wird. Autophosphorylierung an Threonin 288 (T288) ist für die Aktivität von Aurora-A essentiell (Walter et al., 2000). Die Versuche mit rekombinantem Aurora-A Protein aus Insektenzellen und Bakterien zeigten, dass die veränderte elektrophoretische Mobilität der Kinase ein Ereignis darstellt, für welches nur die autokatalytische Aktivität von Aurora-A notwendig scheint, was prinzipiell darauf hindeutet, dass ein autoregulatorischer Mechanismus vorliegt (siehe oben). Da Aurora-A eine Serin-Threonin-Kinase ist, kommt für eine cis Regulation neben der Autophosphorylierung an T288 auch eine Autophosphorylierung an weiteren Serin- und Threoninresten in Frage. Es stellte sich somit die Frage, ob T288 die einzige Aurora-A Autophosphorylierungsstelle ist.

Um den Autophosphorylierungsstatus rekombinanter Aurora-A zu analysieren, wurde Aurora-A aus Sf9 Zellen in Gegenwart von $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ *in vitro* autophosphoryliert und eine Phosphoaminosäurenanalyse durchgeführt. Dies zeigte, dass die Autophosphorylierung prominent an Serin(en) stattfand, in geringerer Menge aber auch Threonin(e) autophosphoryliert wurden (Abb. 14A). Phosphorylierung an T288 der WT-

Form der Kinase konnte durch Verwendung eines phosphospezifischen Antikörpers (NEB) bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

Um den Einfluss der aminoterminalen-Domäne auf die Kinaseaktivität zu analysieren, wurden verschiedene Aurora-A Deletionskonstrukte in *E.coli* exprimiert. Hierzu wurden die aminoterminal-Domäne (AS 1-129), sowie die carboxyterminale Kinasedomäne (AS 124-403) als his-Fusionsproteine in *E.coli* exprimiert (Abb. 14B). Das aminoterminal-Konstrukt zeigte, wie zu erwarten, keine katalytische Aktivität. Überraschenderweise war für die hier verwendete katalytische Domäne (AS 124-403) im Kinaseassay ebenfalls keine Kinaseaktivität festzustellen (Abb. 14B), obwohl ein Konstrukt der AS 125-391 katalytische Aktivität zeigt (Nowakowski et al., 2002). GST-Aurora-A WT zeigte neben einer Autophosphorylierung auch eine Transphosphorylierung der KD Form der Kinase (Daten nicht gezeigt). Um die Autophosphorylierungsstellen in Aurora-A weiter zu kartieren, wurden daher die beiden oben beschriebenen, katalytisch nicht aktiven, Deletionskonstrukte als Substrate der WT GST-Aurora-A getestet. Es wurde die katalytische Domäne, nicht jedoch die regulatorische Domäne von Aurora-A transphosphoryliert (Abb. 14B,C).

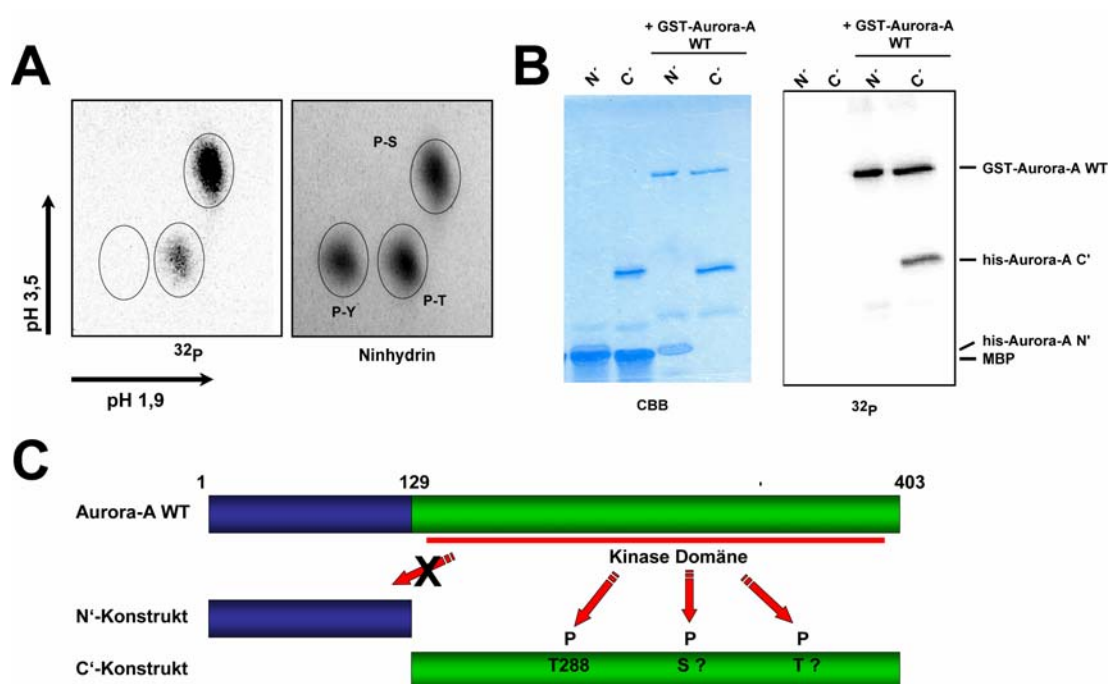


Abb. 14 : Autophosphorylierung rekombinanter Aurora-A.

(A) Phosphoaminosäurenanalyse des rekombinanten, ^{32}P -markierten GST-Aurora-A Proteins (links). Ninhydrin-Färbung (rechts) zeigt das Migrationsverhalten von Phosphoaminosäure Standards.

(B) Coomassie BB Gel (links) und Autoradiogramm (rechts) eines *in vitro* Kinaseassays. Die Aktivität rekombinanter his-Aurora-A-N und -C wurde gegen MBP als Substrat getestet. GST-Aurora-A wurde benutzt, um das -N und -C Konstrukt in trans zu phosphorylieren.

(C) Schematische Darstellung der Konstrukte und deren Transphosphorylierung durch Aurora-A WT.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass sowohl aus Sf9 Insektenzellen, als auch aus *E.coli* funktionelle, rekombinante Aurora-A Kinase isoliert werden konnte. Die Kinaseaktivität war stark abhängig vom verwendeten Expressionssystem, wobei in *E.coli* Aurora-A mit maximaler Aktivität exprimiert werden konnte.

Aurora-A Autophosphorylierung erfolgte sowohl an Serin- als auch an Threoninresten. Diese Autophosphorylierung von Aurora-A scheint essentiell für die Kinaseaktivität, wie die Behandlung rekombinanter Kinase aus *E.coli* mit PP1 zeigte. Transphosphorylierung von rekombinanten Fragmenten von Aurora-A zeigte, dass Autophosphorylierungsstellen in der Kinasedomäne (AS 129-403) liegen.

Aktivierung der humanen Aurora-A Kinase

Die Kinaseaktivität von Aurora-A unterliegt einer zellzyklusabhängigen Regulation und ist in der G₂/M-Phase maximal (Bischoff et al., 1998). In vorausgegangenen Studien wurde die Kinaseaktivität jedoch meist abhängig von der Proteinmenge als Gesamtaktivität in der Zelle betrachtet. Um zu analysieren, ob eine intrinsische Regulation der Kinaseaktivität in der M-Phase, unabhängig von der Proteinmenge vorliegt, wurden myc-Aurora-A WT und KD in der humanen Nierenzelllinie 293T überexprimiert. Hierdurch konnte die endogene, zellzyklusabhängige, Regulation der Proteinmenge von Aurora-A kompensiert werden. Transfizierte Zellen wurden mit Nocodazol beziehungsweise Aphidicolin behandelt. Myc-Aurora-A wurde über den monoklonalen Antikörper 9E10 aus Extrakten dieser Zellen immunpräzipitiert und ein Kinaseassay durchgeführt. Die Autophosphorylierung von Aurora-A war in den M-Phase Extrakten größer als in Interphase Extrakten (Abb. 15). Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Autophosphorylierung über eine Mitose-spezifische Aktivität reguliert wird. Durch Western-Blot-Analysen wurde gezeigt, dass dies nicht auf unterschiedliche Konzentrationen der Kinase zurückzuführen war (Abb. 15). Zusätzlich war spezifisch in den M-Phase Präzipitaten eine Phosphorylierungsbande bei etwa 100 kDa zu erkennen (Abb. 15, Pfeil).

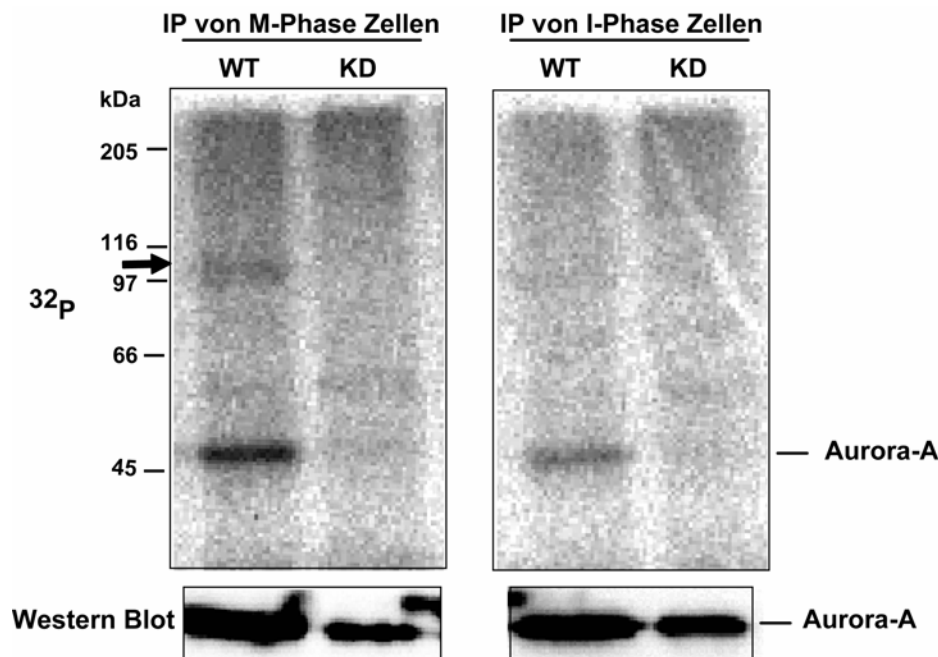


Abb. 15 : Vergleich der Aurora-A Kinaseaktivität von mitotischen und Interphase-Zellen.

In vitro Kinaseassays mit [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP von überexprimierter myc-Aurora-A WT und KD, isoliert aus 293T Zellen, welche in der M- beziehungsweise I-Phase arretiert wurden. Western-Blot-Analyse mit dem Aurora-A Antikörper zeigt, dass nahezu gleiche Mengen an Aurora-A präzipitiert wurden (unten). Autoradiogramm des Kinaseassays mit Größenstandard (oben). Der Pfeil gibt die 100 kDa Bande an.

Aufreinigung eines Aurora-A spezifischen polyklonalen Antikörpers

Um das endogene humane Aurora-A Protein näher charakterisieren zu können, wurde ein spezifischer Antikörper gegen Aurora-A generiert. Hierzu wurde die carboxyterminale Peptidsequenz „CQNKESASKQS“ als Antigen verwendet. Ein gegen dieses Peptid reaktives, polyklonales Kaninchen-Serum wurde von Patrick Meraldi hergestellt. Dieses erkannte in Western-Blot-Analysen mit Zelllysaten aus humanen Tumorzelllinien jedoch mehrere Proteine (Abb. 16A). Das Serum wurde daher in der vorliegenden Arbeit über eine Affinitätschromatographie-Säule mit dem kovalent gebundenen, antigenen Peptid aufgereinigt. Wie in Abb. 16A dargestellt, erkannte der affinitätsgereinigte Antikörper in Zelllysaten von humanen Cervixkarzinomzellen (HeLa) spezifisch nur ein Protein mit dem erwarteten Molekulargewicht von Aurora-A (48 kDa). Der Antikörper zeigte, wie für Aurora-A zu erwarten, mit Lysaten aus Interphasezellen stets ein geringeres Signal als mit mitotischen Zelllysaten (Abb. 16A).

Um die endogene Aurora-A Kinase aus Zelllysaten aufzureinigen zu können, wurde der affinitätsgereinigte Antikörper des weiteren auf seine Fähigkeit hin getestet, aus Zellextrakten Aurora-A zu präzipitieren. Hierzu wurde er an eine Protein-A-Matrix

gebunden und in mitotischen Zellextrakten von HeLa S3 Zellen inkubiert. Wie in Abb. 16B zu sehen, erkannte der Antikörper Aurora-A in Western-Blot-Analysen mit diesen Immunpräzipitationen bei etwa 48 kDa. Diese Bande war nicht in Immunpräzipitationen zu sehen, in denen der Aurora-A Antikörper mit dem antigenen-Peptid abgesättigt wurde (Abb. 16B). Um zu zeigen, dass die präzipitierte Aurora-A Kinase katalytisch aktiv war, wurden Kinaseassays mit den aus mitotischen HeLa Zellextrakten präzipitierten Aurora-A/Antikörper-Komplexen durchgeführt und die Kinaseaktivität gegen MBP getestet. Der präzipitierte Kinasekomplex zeigte *in vitro* eine Kinaseaktivität, woraus geschlossen werden konnte, dass der Antikörper die katalytische Aktivität der präzipitierten Kinase nicht inhibierte (Daten nicht gezeigt).

Zusätzlich wurde der Aurora-A Antikörper ebenfalls für eine Verwendung in Immunfluoreszenz-Analysen getestet. Der Antikörper zeigte in Zellen der Osteosarkomazelllinie U2OS ein Signal an den Centrosomen (ab der G₂-Phase), sowie an der mitotischen Spindel. Die Spezifität dieser Signale konnte durch Kompetition mit dem antigenen-Peptid bestätigt werden. Hierbei konnten alle Signale in mitotischen und G₂-Zellen inhibiert werden (Abb. 16C).

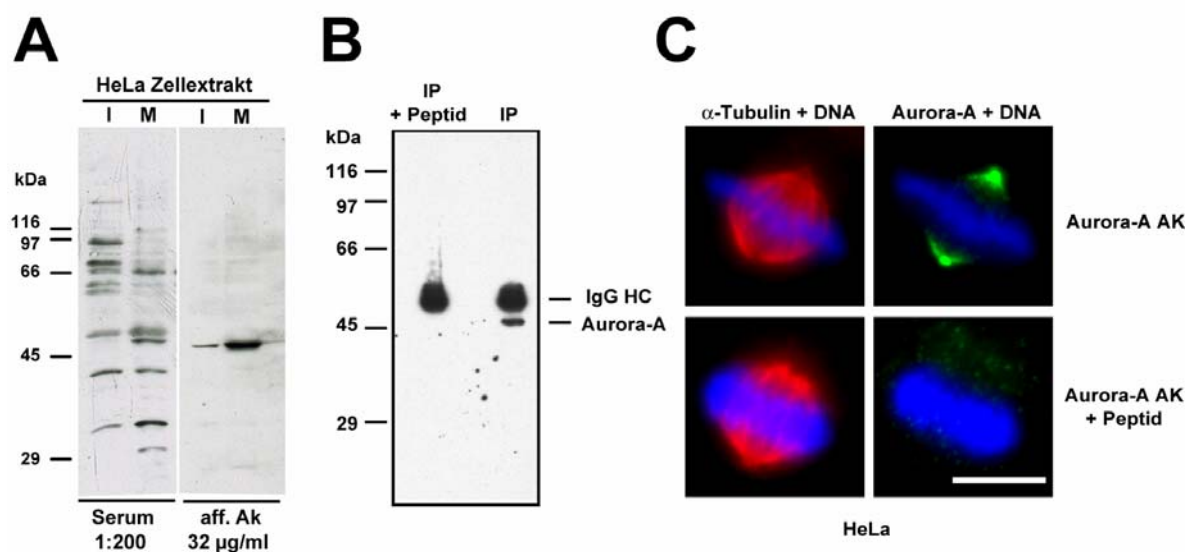


Abb. 16 : Charakterisierung des polyklonalen Aurora-A Antikörpers.

(A) 20 µg HeLa Zellextrakt aus Interphase - und mitotischen Zellen wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und in Western-Blot-Analysen mit dem anti-Aurora-A Serum (links) sowie dem affinitätsgereinigten Aurora-A Antikörper (rechts) inkubiert. Das Laufverhalten des Größenstandard ist angegeben.

(B) Aurora-A Western-Blot-Analyse von Immunpräzipitationen mit den anti-Aurora-A Antikörper aus mitotischen HeLa Zellextrakten. Als Kontrolle wurde das antigene Peptid zur Kompetition dem Zellextrakt zugegeben.

(C) Indirekte Immunfluoreszenz mit in Methanol fixierten HeLa S3 Zellen. Färbung mit dem Aurora-A Antikörper (oben rechts) beziehungsweise dem mit dem mit antigenen Peptid abgesättigten Aurora-A Antikörper (unten rechts) ist dargestellt. Die Spindel derselben Zelle ist mit einem α -Tubulin Antikörper dargestellt (links). Der Größenbalken entspricht 10 µm.

Subzelluläre Lokalisation von Aurora-A

Um die subzelluläre Lokalisation von Aurora-A im Detail zu analysieren, wurden Immunfluoreszenzanalysen mit dem aufgereinigten Aurora-A Antikörper in humanen Zellen durchgeführt. Hierzu wurden die Osteosarkomazelllinie U2OS, sowie die Cervixcarzinomzelllinie HeLa verwendet. In beiden Zelllinien wurde eine nahezu identische Lokalisation von Aurora-A beobachtet: Aurora-A war in G₁-Phase Zellen nicht nachzuweisen (Abb. 17A). Ab der G₂-Phase war ein Signal an den Centrosomen und ab Beginn des Aufbaus der mitotischen Spindel in der Prometaphase auch an der Spindel zu erkennen. Das Aurora-A Signal zeigte hier eine partielle Co-Lokalisation mit α -Tubulin (Abb. 17B). Interessanterweise war Aurora-A ab Ende der Anaphase auch an der Teilungsfurche und später am Mittelkörper zu erkennen (Abb. 17 A,B). Das Signal von Aurora-A war hierbei an den Spindelpolen immer am stärksten. Der in dieser Studie generierte Aurora-A Antikörper zeigte somit eine Färbung, vergleichbar mit der anderer publizierter Aurora-A Antikörper (Bischoff et al., 1998; Kimura et al., 1997a).

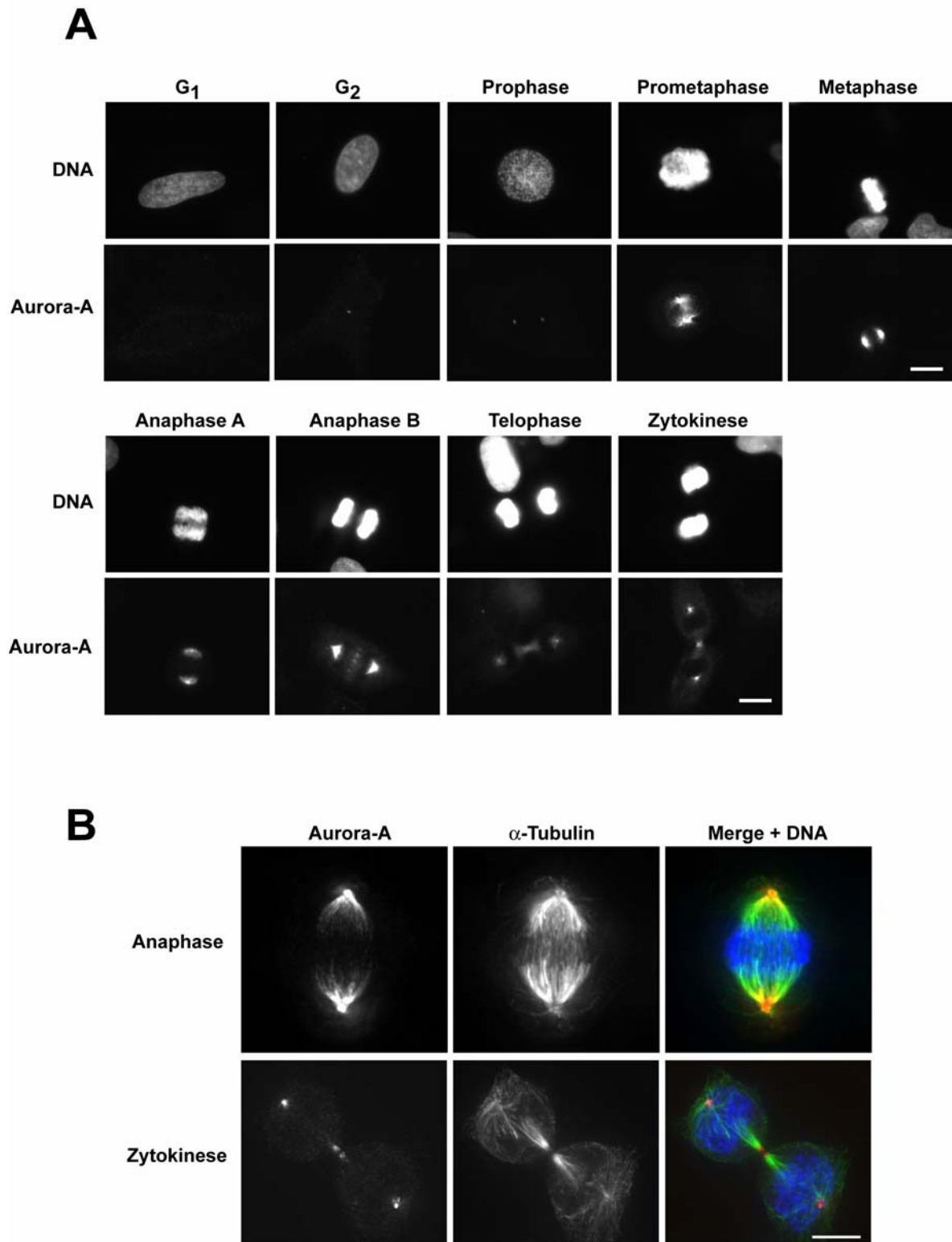


Abb. 17 : Subzelluläre Lokalisation von Aurora-A.

Indirekte Immunfluoreszenz mit dem affinitätsgereinigten Aurora-A Antikörper mit Methanol fixierten U2OS Zellen. Größenbalken entsprechen 10 μ m.

(A) Lokalisation von Aurora-A in den verschiedenen Phasen der Mitose.

(B) Dekonvolutionsaufnahmen der Lokalisation von Aurora-A (links, rot) und α -Tubulin (Mitte, grün) an der mitotischen Spindel. Co-Lokalisation ist durch eine Komposit-Aufnahmen der beiden Färbungen, zusammen mit DNA Färbung gezeigt.

Phänotypanalyse über Depletion von Aurora-A durch RNAi

Während in *X.laevis* (Giet und Prigent, 2000) und *C.elegans* detaillierte Studien zum Phänotyp der Aurora-A Depletion vorliegen, waren für die humane Aurora-A zum Zeitpunkt der Arbeit noch keine Analysen durchgeführt worden. Aurora-A wurde in humanen Zellen mittels RNAi, über synthetische siRNA Duplexe depletiert. Hierzu wurden zwei verschiedene Aurora-A spezifische RNAi Duplexe hergestellt (Aurora-A I und Aurora-A II) und in HeLa S3 Zellen transfiziert. Als Kontrolle wurde ein gegen Luciferase gerichteter Duplex (GL2) verwendet. Die mit den Aurora-A Duplexen beziehungsweise dem GL2 Duplex behandelten Zellen wurden für einen Zeitraum von 72 Stunden mikroskopisch beobachtet und die Effizienz der Depletion von Aurora-A durch Western-Blot-Analyse von Zelllysaten beziehungsweise durch Immunfluoreszenz an fixierten Zellen verfolgt. Beide Duplexe reduzierten die Aurora-A Proteinmenge nach 72 Stunden nahezu vollständig und zeigten vergleichbare Effizienzen (Abb. 18A und Daten nicht gezeigt). Die Behandlung mit dem Kontroll-Duplex (GL2) hatte hingegen keine Auswirkungen auf Aurora-A Proteinmenge (Abb. 18A).

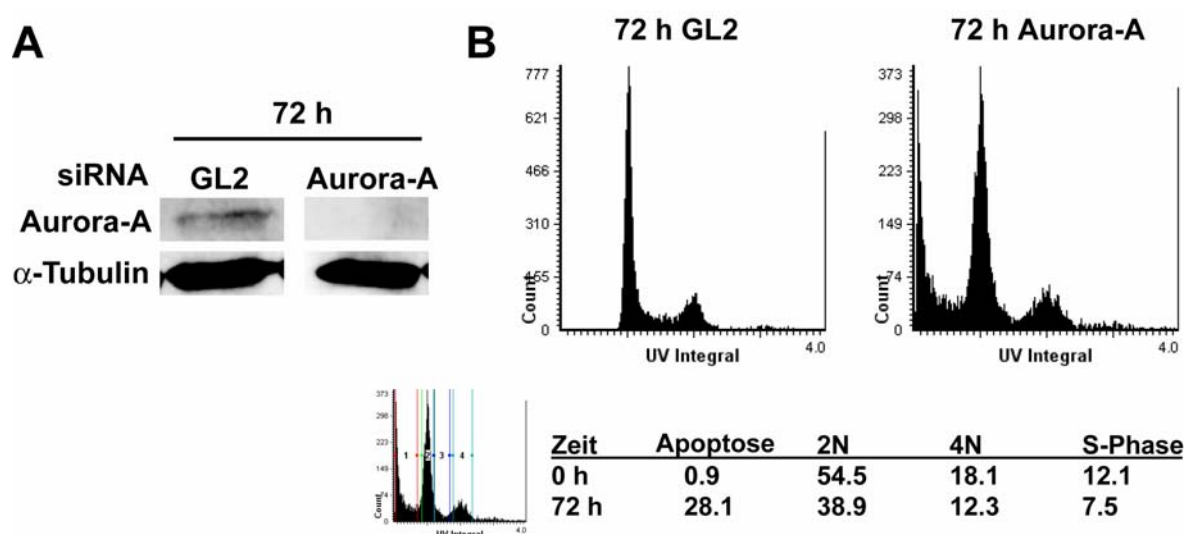


Abb. 18 : DNA Profil nach Aurora-A Depletion über siRNA.

(A) Western-Blot-Analyse von Zelllysaten von Zellen welche für 72 Stunden mit dem Aurora-A Duplex, beziehungsweise einem Kontroll-Duplex (GL2) behandelt wurden. α -Tubulin zeigt gleiche Ladung des Gels.

(B) LCS Analyse des DNA Gehalts von HeLa Zellen, welche für 72 Stunden mit dem Aurora-A siRNA Duplex, beziehungsweise einem Kontroll-Duplex (GL2) behandelt wurden. Auf den DNA Gehalt (1=2N) normalisierte Histogramme sind dargestellt. Die Histogramme wurden, wie links angegeben, ausgewertet und die prozentualen Anteile der Zellen in den verschiedenen Zellzyklus-Phasen sind in der Tabelle angegeben.

Um zu untersuchen, ob Aurora-A Depletion zu einem Zellzyklus-Arrest führt, wurden DNA Profile dieser Zellen mittels LSC Analysen erstellt. Wie die DNA Profile in Abb. 18B belegen, konnte keine Beeinflussung des Fortschreitens einer asynchronen Zellpopulation im Zellzyklus nach Behandlung mit dem Aurora-A Duplex festgestellt werden. Es wurde aber eine starke Zunahme an apoptotischen Zellen nach 72 Stunden um etwa 30 % beobachtet, wohingegen die Behandlung mit dem GL2-Duplex in nur etwa 1 % der Zellen Apoptose induzierte (Abb. 18B).

Die Anzahl der Zellen in der G₁-Phase (2N), G₂-Phase (4N), sowie in der S-Phase nahm im nahezu gleichen Maße, zugunsten dieser apoptotischen Zellpopulation ab. Dass es sich um apoptotische Zellen handelte, konnte durch Färbung der DNA dieser Zellen und das Auftreten der für Apoptose typischen Kernfragmentierung (Wyllie et al., 1980) gezeigt werden.

Das Auftreten apoptotischer Zellen war reproduzierbar der prominenteste Phänotyp, den die Zellen nach Aurora-A Depletion zeigten und war mit beiden Aurora-A Duplexen nahezu gleich stark ausgeprägt. Lichtmikroskopische Analysen bestätigten dies. Auch hier wurde ein starker Anstieg an apoptotischen Zellen beobachtet, der 2-3-fach über der Kontrolle lag. Gleichzeitig wurde auch hier ein Rückgang der Anzahl an mitotischen und Interphase Zellen festgestellt. Immunfluoreszenz-Analysen zeigten, dass Aurora-A in der Mehrzahl der behandelten Zellen in der Mitose stark reduziert war, jedoch oft noch geringe Restmengen an den Spindelpolen zu detektieren waren (Abb. 19).

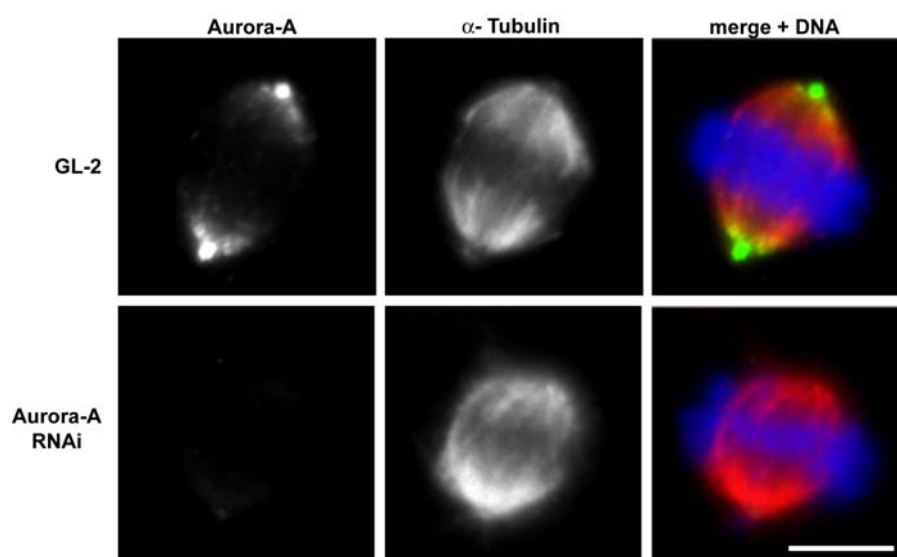


Abb. 19 : siRNA von Aurora-A in HeLa S3 Zellen.

Indirekte Immunfluoreszenz von Methanol fixierten HeLa S3 Zellen, die für 72 Stunden mit dem Aurora-A spezifischen beziehungsweise einem Kontroll siRNA-Duplex (GL2) behandelt wurden. Aurora-A (grün) und α -Tubulin (rot) sind dargestellt. Größenbalken: 10 μ m.

Eine Analyse der mitotischen Spindel in den Aurora-A depletierten Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz gegen α -Tubulin zeigte das Vorhandensein von bipolaren Spindeln, die jedoch zum Teil Defekte zeigten: Die Spindelpole in Aurora-A depletierten Zellen erschienen breiter als die der Kontrolle und es konnten Zellen beobachtet werden, in denen die Ordnung der Spindel-Mikrotubuli gestört erschien (Abb. 19). Es wurden jedoch keine Zellen mit monopolen Spindeln beobachtet.

Zusammenfassung

Im Konsens mit den Daten aus der Literatur konnte gezeigt werden, dass die Aurora-A Kinaseaktivität in humanen Zellen in der Mitose erhöht ist (Bischoff und Plowman, 1999). Ferner wurde ein Aurora-A spezifischer, polyklonaler Antikörper gegen Aurora-A charakterisiert, welcher für Immunfluoreszenzanalysen, Western-Blot-Analyse und Immunpräzipitationen geeignet war. Die subzelluläre Lokalisation von Aurora-A wurde mit diesem Antikörper charakterisiert und bestätigte ebenfalls die publizierten Daten (Bischoff et al., 1998; Kimura et al., 1997a).

Als neuer Ansatz konnte Aurora-A in dieser Studie erstmals mittels siRNA in humanen Zellen depletiert werden. Dies führte zu signifikant erhöhter Apoptose und leichten Spindeldefekten.

Suche nach Interaktionspartnern von Aurora-A

Die Aurora-A Kinase zeigt ein komplexes Regulationsmuster der Lokalisation und der Kinaseaktivität während des Zellzyklus. Es ist daher aufgrund der oben beschriebenen Beobachtungen wahrscheinlich, dass neben der Aktivität auch die Lokalisation von Aurora-A über Wechselwirkung mit Regulatoren beziehungsweise „Targeting“-Faktoren erfolgt. Solche Mechanismen sind zum Beispiel für die Lokalisation von PKA und der Protein Kinase CK1 (Diviani und Scott, 2001; Giet und Prigent, 2000; Sillibourne et al., 2002), sowie für die Aktivierung von CDKs und Aurora-B (Diviani und Scott, 2001; Honda et al., 2003; Morgan, 1997) verantwortlich.

Es wurden daher im Folgenden potentielle Bindungspartner von Aurora-A durch verschiedene Interaktions-Screens gesucht.

Um möglichst sensitiv und expressionsunabhängig Aurora-A Interaktoren zu identifizieren, wurde ein Yeast-Two-Hybrid (Y2H) Screen konzipiert. Hierbei zeigte sich,

dass wie in der Literatur beschrieben (Bischoff et al., 1998; Kiat et al., 2002), Aurora-A WT toxisch für die Hefezellen war. Für den Screen wurde daher Aurora-A KD als AD-Fusionskonstrukt benutzt. Transformanten, die dieses Konstrukt exprimierten, wurden mit einer humanen cDNA-Bibliothek aus fötalem Gehirn transformiert und auf Aufnahme der Plasmide, sowie Interaktion der exprimierten Proteine selektiert. Von $4 \cdot 10^5$ Transformanten zeigten fünf Wachstum bei Selektion auf Interaktion. Ein Kandidat konnte isoliert werden, der auch nach Retransformation noch eine Interaktion mit Aurora-A zeigte. Eine detaillierte Suche nach Homologien in den öffentlichen Datenbanken des NCBI zeigte, dass das Insert dieses Klons (#26) mit Ausnahme von zwei Nukleotiden mit dem Datenbankeintrag gi:27477709 übereinstimmte. Das entsprechende Protein enthielt fünf repetitive SH3-Domänen. Im Screen wurde ein Teil der volllängen cDNA identifiziert, der dem Mittelteil dieser cDNA, der für zwei SH3 Domänen kodiert, entspricht. Nach Überexpression zeigte dieses Proteins in humanen 293T Zellen jedoch keine Lokalisation an mitotische subzelluläre Strukturen (Daten nicht gezeigt). Zudem war das Protein kein *in vitro* Substrat von Aurora-A (Daten nicht gezeigt). Dieser Klon wurde in der vorliegenden Arbeit daher nicht weiter charakterisiert, da zudem eine Interaktion mit Aurora-A mit dem in Zellen überexprimierten Protein nicht eindeutig bestätigt werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Des Weiteren wurden Co-Immunpräzipitationen endogener Aurora-A, sowie Präzipitationen durch Bindung an rekombinante Aurora-A („Fishing“) mit mitotischen Zellextrakten durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Versuche werden im Folgenden detailliert beschrieben.

Aurora-A Co-Immunpräzipitationen aus Zellextrakten

Um Proteinkomplexe der endogenen Aurora-A Kinase zu isolieren, wurden Aurora-A Co-Immunpräzipitationen aus Zellextrakten mitotischer HeLa S3 Zellen durchgeführt. Der oben beschriebene Aurora-A Antikörper wurde hierzu an eine Protein-A-Matrix gebunden. Als Kontrollen für diese Immunpräzipitationen wurden der mit einem 10-fach molaren Überschuss an antigenem Peptid abgesättigte Antikörper sowie die Matrix alleine verwendet. Für die Co-Immunpräzipitationen wurden konzentrierte Zellextrakte (typischerweise 20 mg Gesamt-Protein) verwendet. Hierbei konnte eine über 90%-ige Depletion der Extrakte erreicht werden (Daten nicht gezeigt).

In vier unabhängigen Co-Immunpräzipitations-Experimenten konnte reproduzierbar Aurora-A identifiziert werden, wohingegen die Kinase nicht in den Kontrollen nachzuweisen war. Coomassie Färbung von Polyacrylamidgelen dieser Präzipitate zeigte Banden, welchen spezifisch in den Reaktionen mit dem Aurora-A Antikörper nicht jedoch in den Kontrollpräzipitationen zu erkennen waren (Abb. 20). Um die Identität dieser Proteine festzustellen, wurden die korrespondierenden Banden ausgeschnitten, extrahiert und mit modifiziertem Trypsin behandelt. Die so erhaltenen Peptide wurden durch MALDI-TOF analysiert und die entsprechenden Proteine mittels Datenbanksuchen ermittelt.

Neben Aurora-A, welche stets identifizierbar war, konnten reproduzierbar die Proteine KIAA1007, welches als zwei Banden mit identischen Peptid-Fingerprint auftrat, KIAA1741 und TPX2 identifiziert werden (Abb. 20, Tab. 4). Zusätzlich konnten weitere Proteine identifiziert werden, von denen einige jedoch nicht direkt mit einer Funktion der Mitose in Zusammenhang gebracht werden konnten und die eventuell Verunreinigungen darstellen (Tab. 4).

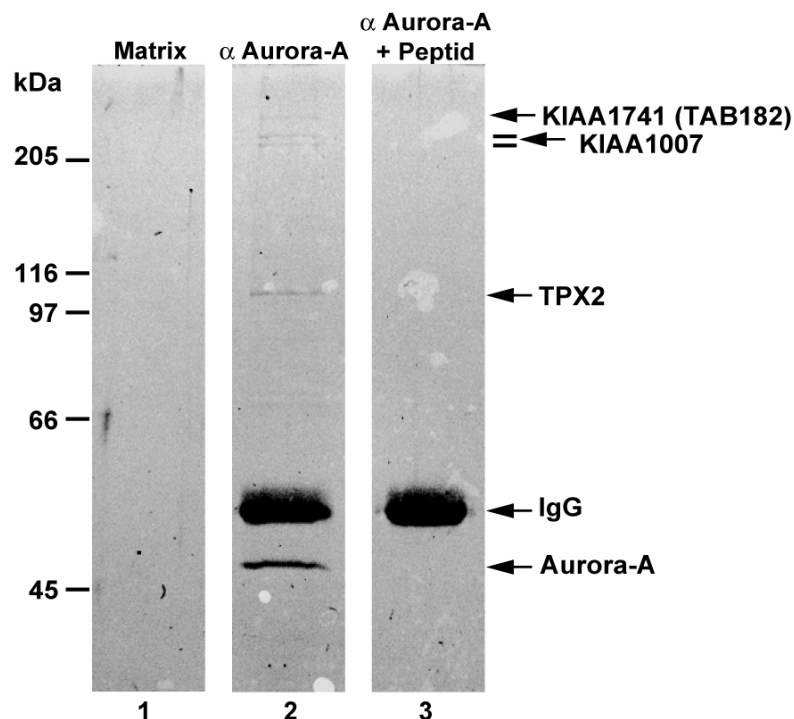


Abb. 20 : Aurora-A Co-Immunpräzipitation aus mitotischen Zellextrakten.

Coomassie BB gefärbtes Gel von Aurora-A Co-Immunpräzipitationen aus mitotischen HeLa S3 Zellextrakten (Spur 2). Als Kontrolle wurden Immunpräzipitationen mit der Matrix alleine (Spur 1), beziehungsweise mit dem mit einem Überschuss an Peptid gesättigten Antikörper (Spur 3) durchgeführt. Pfeile zeigen die präzipitierte Aurora-A Kinase, die Antikörper HC sowie die co-immunpräzipitierten Proteine, welche mittels massenspektrometrischen Fingerabdruck als KIAA1741, KIAA1007 und TPX2 identifiziert wurden.

Die Proteine TPX2 und Eg5 waren die interessantesten Kandidaten, da sie bekannte Spindelproteine sind (Blangy et al., 1995; Heidebrecht et al., 1997). Daneben waren die hochmolekularen Bindungspartner KIAA1741 und KIAA1007 Erfolg versprechende Kandidaten, da für Aurora-A Substrate mit großen Molekulargewichten berichtet wurden (Kimura et al., 1998). Eg5 wurde jedoch nur einmal in den Co-Immunpräzipitationen gefunden. Zudem konnte es durch einen Eg5 spezifischen Antikörper (Blangy et al., 1995) in Western-Blot-Analysen von Aurora-A Co-Immunpräzipitationen nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt) und war, wie oben dargelegt, *in vitro* kein Substrat für Aurora-A. Eg5 wurde in der vorliegenden Arbeit daher nicht weiter analysiert. Die anderen Kandidaten werden weiter unten abgehandelt.

Protein	Acc. Nummer	Lysat
Aurora-A	gi 4507274	Metaphase
TPX2	gi:18044208	Metaphase
KIAA1007	gi 4589658	Metaphase
KIAA1741	gi 12698027	Metaphase
kinesin-like spindle prot. Hksp (Eg5)	gi 7428716	Metaphase
Hypothetisches Protein	gi 13123772	Metaphase
PDT010	gi 7657480	Metaphase
Plectin 1	gi 4505877	Metaphase
Serum Albumin precursor	gi 1351907	Metaphase
unnamed, ring finger 20 like	gi 7023699	Metaphase

Tab. 4: In den Aurora-A Co-Immunpräzipitationen identifizierte Proteine.

Identifikation von Aurora-A Interaktionspartnern über Bindung an rekombinantes Protein („Fishing“)

Als weiteres wurden so genannte „Fishing“-Experimente mit rekombanter GST-Aurora-A WT und KD Kinase durchgeführt, um Antikörper unabhängig Bindungspartner von Aurora-A zu finden. An Glutathion-Sepharose immobilisierte GST-Aurora-A Kinase wurde in mitotischen HeLa S3 Zellextrakten inkubiert. Die Versuche wurden mit der WT Form von Aurora-A als auch mit der KD (K162R) durchgeführt um zwischen Proteinen differenzieren zu können, welche nur die aktive beziehungsweise inaktive Kinase binden.

Mit diesem Ansatz konnten Proteine identifiziert werden, die eine spezifische Interaktion mit der WT Kinase und/oder KD Form, nicht jedoch eine Interaktion mit der Matrix alleine zeigten. Um auszuschließen, dass diese Kandidaten als Verunreinigung in der Aurora-A Präparation enthalten waren, wurde Aurora-A ohne Extrakt-Inkubation als Kontrolle aufgetragen (Abb. 21, Spur 4). Die Banden der spezifischen Bindungspartner

wurden ausgeschnitten und ihre Identität über massenspektrometrischen Fingerabdruck bestimmt. Für eine Vielzahl dieser Proteine konnte so die Identität erhalten werden. Leider war es jedoch nicht möglich für alle Banden die Identität der Proteine zu bestimmen. Interessanterweise konnte wiederum das Protein TPX2 als prominenter Bindungspartner der WT und KD Kinase identifiziert werden. Zudem wurde KIAA1741 identifiziert, welches nur in den Ansätzen mit der WT Kinase nachzuweisen war. Die weiteren identifizierten Proteine stellen, da sie zum Teil eindeutig in Prozessen involviert sind, in denen eine Aurora-A Regulation nicht vermutet wird, wahrscheinlich Verunreinigungen dar.

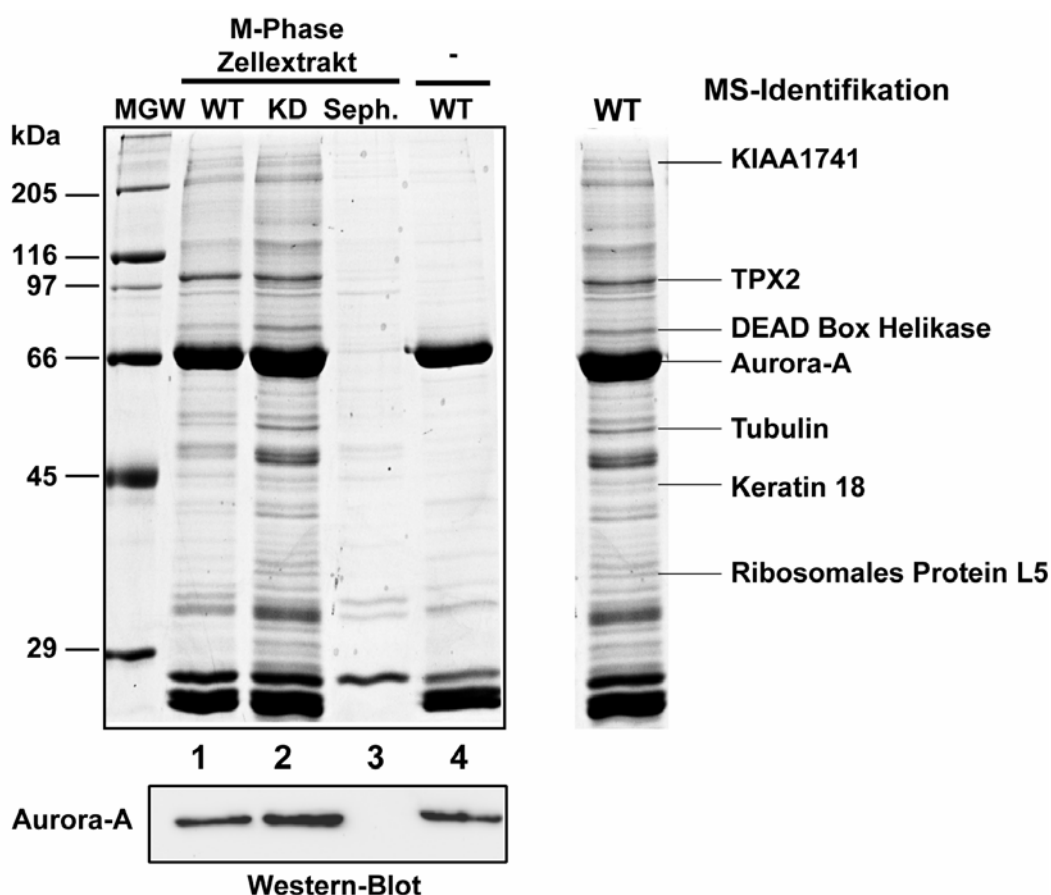


Abb. 21 : „Fishing“ Experiment mit rekombinanter Aurora-A Kinase (WT und KD) in mitotischen Extrakten.

An Glutathion-Sepharose immobilisierte rekombinante GST-Aurora-A WT und KD wurde in mitotischen HeLa S3 Zellextrakten inkubiert und durch SDS-PAGE gefolgt von Coomassie BB Färbung analysiert (Spur 1 und 2). Kontrollen zeigen die Ergebnisse von Matrix, inkubiert in Extrakten (Spur 3) sowie des rekombinanten Proteins ohne Extrakt-Inkubation (Spur 4). Rekombinante GST-Aurora-A ist im Gel bei 66 kDa zu sehen und wurde durch Western-Blot-Analyse nachgewiesen (unten). Ausgeschnittene Banden, die durch massenspektrometrischen Fingerabdruck identifiziert werden konnten sind rechts für die WT Kinase angegeben.

Charakterisierung der potentiellen Aurora-A Bindungspartner

Durch Co-Immunpräzipitationen endogener Aurora-A wurden die Proteine TPX2, KIAA1007 und KIAA1741 als potentielle Bindungspartner von Aurora-A identifiziert. Von diesen konnten TPX2 und KIAA1741 durch Bindungsexperimente mit rekombinanter WT und KD Aurora-A als Bindungspartner der Kinase bestätigt werden.

TPX2 ist von besonderem Interesse, da es ein Spindelprotein ist (Heidebrecht et al., 1997). Die Interaktion von TPX2 mit Aurora-A wird daher im nächsten Kapitel eingehend diskutiert. Zuerst sollen jedoch die unbekannten Proteine KIAA1007 und KIAA1741 und die hiermit erzielten vorläufigen Ergebnisse dargestellt werden.

Charakterisierung des Interaktionspartners KIAA1007

KIAA1007 konnte als potentieller Bindungspartner von Aurora-A in den Co-Immunpräzipitationen identifiziert werden. Interessanterweise trat dieses Protein stets als Doppelbande auf (siehe Abb. 20), wobei beide Banden identische tryptische Peptide ergaben.

Um KIAA1007 als Bindungspartner von Aurora-A zu bestätigen und zu charakterisieren, wurde dieses Protein im Folgenden näher analysiert.

Klonierung und Sequenzanalyse der KIAA1007 cDNA

Um eine Interaktion von KIAA1007 mit Aurora-A zu bestätigen und die subzelluläre Lokalisation von KIAA1007 in eukaryotischen Zellen zu analysieren, wurde die KIAA1007 cDNA in Expressionsvektoren kloniert. Datenbanksuche zeigte, dass das 5' Ende der KIAA1007 cDNA nicht bekannt war. Es wurde daher zunächst der carboxyterminale Teil des Proteins (109 kDa) kloniert, welcher dem KIAA1007 Datenbank Eintrag (gi:4589657) entsprach. PHI-BLAST Suche (Altschul et al., 1997) mit diesem translatierten KIAA1007 Klon, identifizierte homologe Proteine in *D.discoideum*, *C.elegans*, *D.melanogaster*, und *A.thaliana* (Abb. 22). Alle diese Proteine zeigten eine starke Konservierung von zwei carboxyterminalen Bereichen (Abb. 22). Es konnten jedoch keine bekannten Domänen identifiziert werden.

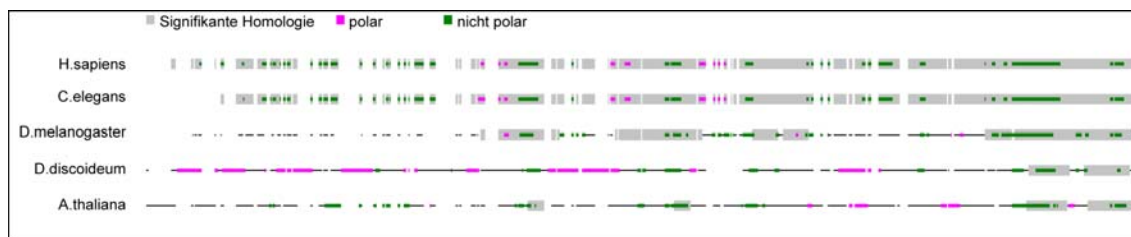


Abb. 22 : Alignment von KIAA1007 und homologen Proteinen.

Alignment von KIAA1007 (gi:20521724) mit homologen Proteinen aus *C.elegans* (gi:532816), *D.melanogaster* (gi:21645541), *D.discoideum* (gi:21070588) und *A.thaliana* (gi:15217614). BLOSUM 62 Matrix.

KIAA1007 Lokalisation in humanen Zellen

Das partielle KIAA1007 Protein wurde als myc- und EGFP-Fusionsprotein in humanen HeLa Zellen exprimiert und die subzelluläre Lokalisation dieser Konstrukte durch indirekte Immunfluoreszenz beziehungsweise Autofluoreszenz analysiert. Sowohl das EGFP- als auch das myc-Fusionsprotein, zeigten in Interphasezellen neben einer diffusen zytoplasmatischen Lokalisation, ein starkes nukleäres Signal (Abb. 23). Beide Konstrukte lokalisierten zudem an den Centrosomen in der Interphase, nicht jedoch an den Spindelpolen in der Mitose, wie durch Co-Färbung mit γ -Tubulin beziehungsweise Aurora-A gezeigt werden konnte (Abb. 23). In der Mitose wurde hingegen keine eindeutige Lokalisation mit Komponenten der mitotischen Spindel beobachtet und die Anreicherung an den Interphase-Centrosomen erschien relativ schwach (Abb. 23).

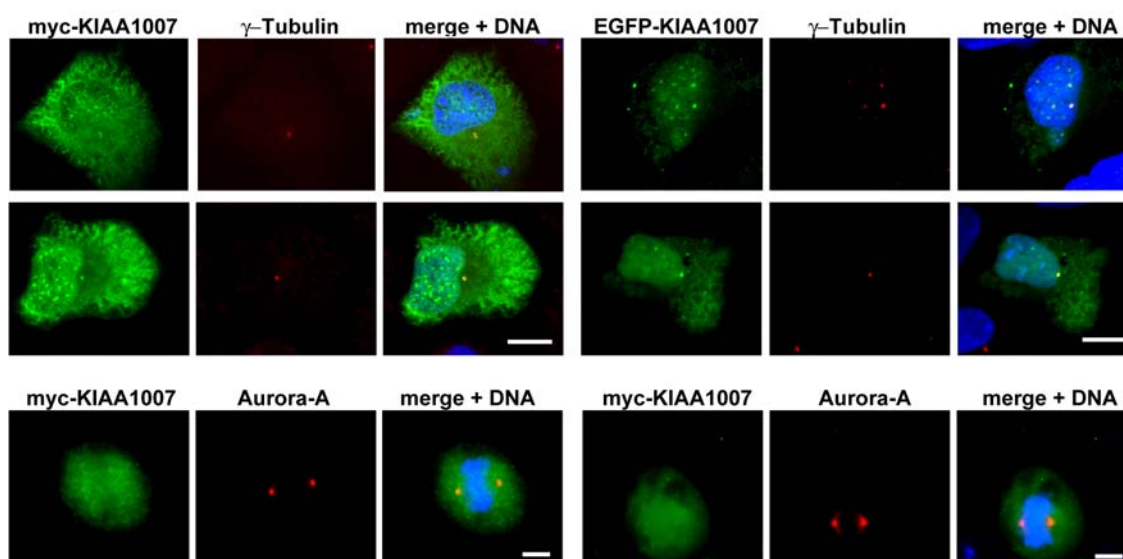


Abb. 23 : Lokalisation des partiellen carboxyterminalen KIAA1007 Proteins in U2OS Zellen.

Indirekte Immunfluoreszenz des partiellen Myc-KIAA1007 Proteins in Methanol fixierten U2OS Zellen in der Interphase (oben) und der Metaphase (unten). GFP und myc (grün) sowie γ -Tubulin und Aurora-A (rot) wurden durch spezifische Antikörper beziehungsweise Autofluoreszenz dargestellt. Größenbalken entsprechen 10 μ m.

KIAA1007 Interaktions- und Phosphorylierungsstudien

Um die Bindung von KIAA1007 an Aurora-A zu bestätigen, wurde das partielle myc-KIAA1007 Protein in 293T Zellen exprimiert und über den myc-tag mit dem α -myc mAK (9E10) immunpräzipitiert. Die Zellen wurden durch Behandlung mit Nocodazol in der Prometaphase arretiert. Alternativ wurden asynchrone Kulturen verwendet. Als Kontrollen wurden Zellen mit dem leeren Vektor transfiziert und Immunpräzipitationen durchgeführt. Western-Blot-Analysen zeigten, dass Aurora-A mit myc-KIAA1007 co-immunpräzipitierte, nicht jedoch in den Kontrollen nachgewiesen wurde (Abb. 24A). Dies bestätigte die Interaktion der beiden Proteine *in vivo*. Um zu testen, ob das KIAA1007 Fragment auch ein Substrat von Aurora-A ist, wurde das in Prometaphase beziehungsweise asynchronen 293T Zellen exprimierte KIAA1007 Protein in einem *in vitro* Kinaseassay mit rekombinanter GST-Aurora-A verwendet. Als Kontrolle wurden Immunpräzipitate aus Lysaten von Zellen durchgeführt, welche mit dem leeren Vektor transfiziert wurden.

Das partielle KIAA1007 Protein zeigte jedoch nur eine geringe ^{32}P -Inkorporation, wenn es mit der aktiven Aurora-A Kinase inkubiert wurde, die nicht mit der KD Mutante beobachtet wurde (Abb. 24B).

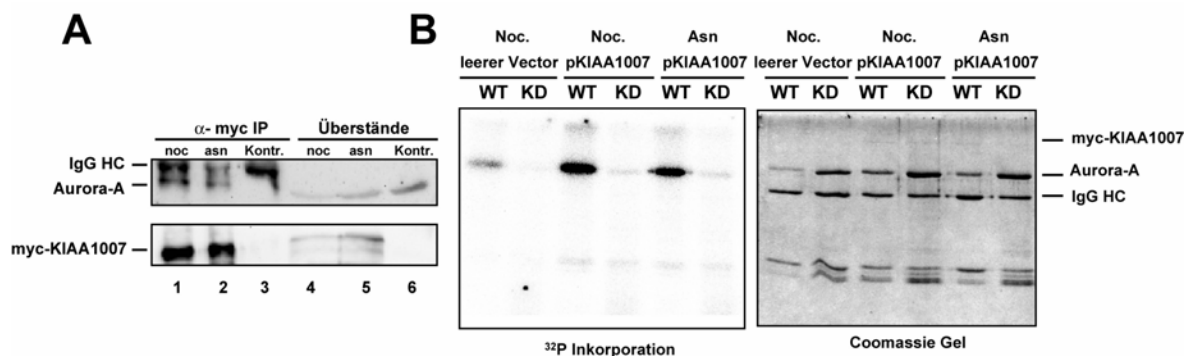


Abb. 24 : KIAA1007 Co-Immunpräzipitation und *in vitro* Kinaseassays mit Aurora-A.

(A) myc-KIAA1007 wurde in 293T Zellen exprimiert. Die Zellen wurden durch Nocodazol (Noc.) in der Mitose arretiert (Spur 1 und 4), beziehungsweise als asynchrone Kultur (Asn) geerntet (Spur 2 und 5). Als Kontrolle wurden Zellen mit dem leeren Vektor transfiziert (Spur 3 und 6). Myc-KIAA1007 wurde immunpräzipitiert und in Western-Blot-Analyse mit Antikörpern gegen Aurora-A (oben) und myc (unten) analysiert. Immunpräzipitationen sind 5x konzentrierter als die Überstände.

(B) *In vitro* Kinaseassay des präzipitierten KIAA1007 Proteins mit rekombinanter GST-Aurora-A in Gegenwart von $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$. Autoradiogramm (links) und korrespondierendes Coomassie BB gefärbtes Gel (rechts) sind gezeigt. Als Kontrolle wurden Immunpräzipitationen aus Zelllysaten von Zellen, welche mit dem leeren Vektor transfiziert wurden, durchgeführt. Das Laufverhalten der verwendeten Proteine ist rechts angegeben.

Zusammenfassung

Die Interaktion von KIAA1007 mit Aurora-A konnte durch Immunpräzipitation von in 293T Zellen exprimierten, partiellen myc-KIAA1007 Protein bestätigt werden. Da ein partielles carboxyterminales Konstrukt von KIAA1007 für die Interaktion ausreichend war, scheint diese Domäne von KIAA1007 die Interaktion mit Aurora-A zu vermitteln. Dass keine eindeutige *in vitro* Phosphorylierung des partiellen KIAA1007 Proteins gezeigt werden konnte, legt ferner den Schluss nahe, dass KIAA1007 entweder kein Substrat von Aurora-A ist, beziehungsweise dass die Phosphorylierungsstelle in dem nicht klonierten aminoterminalen Bereich des Proteins liegt. Lokalisationsstudien zeigten, dass das partielle KIAA1007 Protein in Interphase-Zellen an die Centrosomen lokalisiert.

Charakterisierung des Interaktionspartners KIAA1741

KIAA1741 konnte, wie oben dargelegt, über Bindungsexperimente und Co-Immunpräzipitationen als ein potentieller Bindungspartner von Aurora-A identifiziert werden.

Klonierung der KIAA1741 cDNA

Um die Interaktion zwischen Aurora-A und KIAA1741 zu verifizieren und Informationen über die subzelluläre Lokalisation von KIAA1741 zu erhalten, wurde die KIAA1741 cDNA kloniert. Suche in EST Datenbanken zeigte, dass der Eintrag „gi:12698026“ für den 3' Teil der KIAA1741 cDNA kodiert. Die entsprechende 4 kb cDNA, welche ein 109 kDa Protein kodiert, wurde als EGFP-Fusionskonstrukt kloniert. Zudem wurde durch 5' RACE das fehlende 5' Ende der KIAA1741 cDNA experimentell bestimmt. Durch PCR aus cDNA-Bibliotheken konnten 894 nt eindeutig dem 5' Ende des KIAA1741 Gens zugeordnet werden. Somit entspricht das volllängen KIAA1741 Gen 5187 nt welche 1729 Aminosäuren (entsprechend 181,8 kDa) kodieren. Ein neu ermitteltes ATG in diesem Bereich entsprach einem EST-Klon (AL533948) und stimmte mit einer Vorhersage für die volllängen cDNA (GENESCANW 1.0) überein. Zudem konnte ein tryptisches-Peptid des in den Aurora-A Co-Immunpräzipitationen identifizierten KIAA1741 Proteins eindeutig diesem neu ermittelten, translatierten Abschnitt zugeordnet werden (Daten nicht gezeigt). Dies zeigte, dass das neue ATG dem Start des volllängen

KIAA1741 Proteins entsprach. Unabhängig von dieser Studie wurde dies durch eine andere Arbeitsgruppe bestätigt, die KIAA1741 als Bindungspartner der humanen Tankyrase 1 identifizierte und als TAB182 (Tankyrase-binding Protein of 182 kDa) veröffentlichte (Seimiya und Smith, 2002).

Expression-Studien zeigten, dass das partielle EGFP-KIAA1741 Protein, als auch das volllängen myc-KIAA1741 Protein in U2OS, HeLa und 293T Zellen exprimiert werden konnte. Das partielle Protein zeigte eine geringere elektrophoretische Mobilität im SDS-PAGE als erwartet und war bei etwa 200 kDa zu erkennen, obwohl die berechnete Masse 124 kDa beträgt. Ähnlich verhielt es sich mit dem volllängen Protein. Eine Erklärung für dieses Verhalten könnte der sehr niedrigen pI des KIAA1741 Proteins (pI=4) sein.

Generierung eines spezifischen Antikörpers gegen KIAA1741

Um das endogene KIAA1741 Protein näher charakterisieren zu können, wurde ein polyklonales Antiserum gegen ein 44 kDa Fragment (AS 563-975) des Mittelteils von KIAA1741 in Kaninchen erzeugt. In Western-Blot-Analysen erkannte dies (ab der 2. Blutung) ein Protein von über 205 kDa, was der erwarteten Größe von KIAA1741 entsprach (Abb. 25A). Dieses Signal konnte durch Zugabe des antigenen Proteins kompetitiert werden (Abb. 25A). In Immunfluoreszenz-Analysen zeigte dieses Antiserum eine Färbung des Zellkortex in der I- und M-Phase und ein diffuses zytoplasmatisches Signal in mitotischen Zellen, während das Präimmunserum keine spezifischen subzellulären Strukturen erkannte (Abb. 25B). Da das KIAA1741 reaktive Serum in Western-Blot-Analysen noch weitere Proteine erkannte (Abb. 25A), wurde es über das kovalent an Matrix gebundene Antigen affinitätsgereinigt. Die so aufgereinigten Antikörper erkannten in Western-Blot-Analysen spezifisch nur die KIAA1741 Bande und lieferten ein deutliches Signal in den Immunfluoreszenz-Analysen (siehe unten). Alternativ wurde der von Seimiya et al. (2002) veröffentlichte Antikörper verwendet. Beide Antikörper detektierten in Western-Blot-Analysen die gleichen Banden (Daten nicht gezeigt) und dekorierten in Immunfluoreszenz-Analysen die gleichen Strukturen. Der Antikörper von Seimia et al. (2002) reagierte, wie beschrieben, in Immunfluoreszenz-Analysen jedoch auch mit Antigenen im Kern und kondensierten Chromosomen, wohingegen der in dieser Arbeit generierte Antikörper diese Strukturen nicht erkannte.

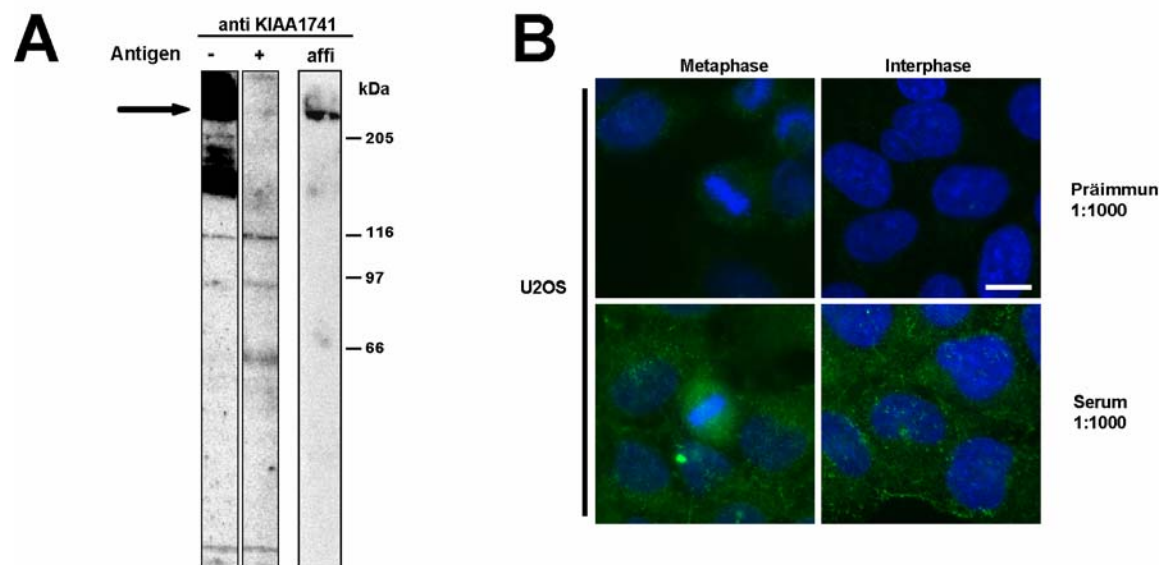


Abb. 25 : Charakterisierung des KIAA1741 Antikörpers.

(A) Western-Blot-Analyse des KIAA1741 Serums (1:1000, 2. Blutung) mit Zellextrakten aus mitotischen HeLa S3 Zellen. Als Kontrolle wurde das Serum mit einem Überschuss an Antigen inkubiert (Spur 2). Die Western-Blot-Analyse rechts zeigt das Erkennungsmuster des affinitätsgereinigten Antikörpers (16 µg/ml).

(B) Indirekte Immunfluoreszenz Methanol fixierter U2OS Zellen mit dem Präimmunserum (1:1000) und dem KIAA1741 reaktive Serum (1:1000). Größenbalken: 10 µm.

Interaktions- und Phosphorylierungsstudien mit KIAA1741

Um zu zeigen, dass das in den Aurora-A Co-Immunpräzipitationen identifizierte KIAA1741 Protein mit dem hier charakterisierten Protein identisch war, wurden Western-Blot-Analysen von Aurora-A Co-Immunpräzipitationen mit dem KIAA1741 Antikörper durchgeführt. Der KIAA1741 Antikörper zeigte ein Signal in den Zelllysaten sowie in den Aurora-A Präzipitaten, nicht jedoch in den Kontroll-Immunpräzipitation (Abb. 26A). Um die Bindung von endogenem volllängen KIAA1741 an Aurora-A zu bestätigen und zu untersuchen, ob Kinaseaktivität für eine Bindung notwendig ist, wurde rekombinante WT und KD GST-Aurora-A in mitotischen sowie Interphase Zellextrakten inkubiert und über Glutathion-Sepharose präzipitiert. KIAA1741 konnte in den Präzipitaten mit der WT und der KD Aurora-A aus Interphase Extrakten nachgewiesen werden (Abb. 26B). Hingegen zeigte KIAA1741 aus mitotischen Extrakten eine bessere Bindung an die WT- als die KD Form der Kinase (Abb. 26B). Keine Bindung konnte an die, als Kontrolle verwendete, Glutathion-Sepharose beobachtet werden (Abb. 26B). Somit konnte gezeigt werden, dass KIAA1741 in Interphase Extrakten unabhängig von der Kinaseaktivität mit Aurora-A interagiert, wohingegen in mitotischen Extrakten die Bindung abhängig von der

Kinaseaktivität schien. Eine Interaktion mit endogener Aurora-A wurde auch mit dem partiellen EGFP-KIAA1741 Konstrukt beobachtet, wenn dieses als EGFP-Fusionsprotein in 293T Zellen exprimiert und mit Hilfe eines GFP-spezifischen Antikörpers aus Lysaten dieser Zellen präzipitiert wurde (Daten nicht gezeigt). Die Interaktion von KIAA1741 mit Aurora-A konnte somit bestätigt werden.

Da Aurora-A maximal in der Mitose exprimiert ist, wurde als nächstes untersucht, ob auch KIAA1741, eine zellzyklusabhängige Regulation der Expression zeigt. Hierzu wurde KIAA1741 in Zelllysate von HeLa Zellen in verschiedenen Zellzyklusstadien (freundlicherweise von V.M. Stucke zur Verfügung gestellt) durch Western-Blot-Analyse nachgewiesen (Abb. 26C).

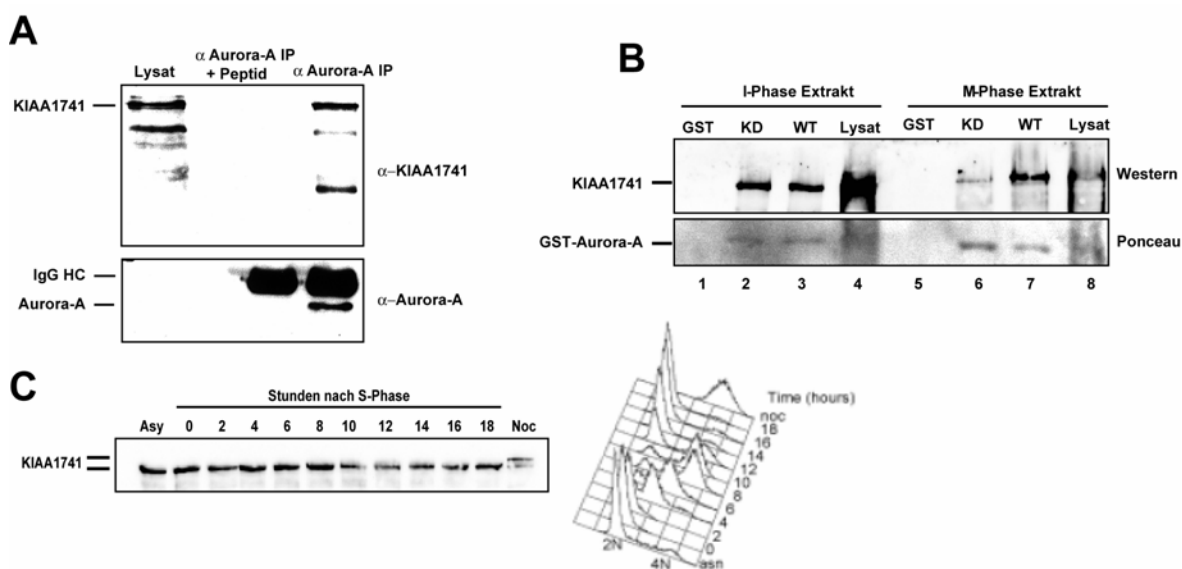


Abb. 26 : KIAA1741 interagiert mit Aurora-A und ist zellzyklusunabhängig exprimiert.

(A) Western-Blot-Analyse einer Aurora-A Co-Immunpräzipitation aus mitotischen HeLa S3 Zelllysaten, gepurifiziert mit dem KIAA1741 und dem Aurora-A Antikörper. Immunpräzipitationen sind etwa 10-mal konzentrierter als das Lysat. Als Kontrolle wurden Immunpräzipitationen mit dem mit einem Überschuss an Peptid gesättigten Antikörper durchgeführt.

(B) Immobilisierte, rekombinante GST-Aurora-A WT und KD wurde in Zellextrakten aus Interphase (Spur 2 und 3) beziehungsweise mitotischen (Spur 6 und 7) HeLa S3 Zellen inkubiert. GST-Aurora-A wurde mit Glutathion-Sepharose präzipitiert. Die untere Abbildung zeigt die Ponceau Färbung der eingesetzten rekombinanten Kinase. Western-Blot-Analyse mit dem KIAA1741 Antikörper zeigt, KIAA1741 in den Zelllysaten (Spur 4 und 8) und in den Aurora-A Co-Präzipitationen aus M- und I-Phase Extrakten (Spur 3 und 7). Als Kontrolle dienten Präzipitationen mit GST (Spur 1 und 5).

(C) Western-Blot-Analyse von Zelllysaten synchronisierter HeLa Zellen (freundlicherweise von V.M. Stucke zur Verfügung gestellt). Zahlen geben die Zeit in Stunden nach Aufhebung eines Aphidicolin-Arrests an. Als Kontrolle wurde Zelllysate aus mit Nocodazol in der Mitose arretierten Zellen (Noc) beziehungsweise einer asynchronen Kultur (Asy) verwendet. Der Zellzyklusverlauf ist rechts anhand einer FACS Analyse dargestellt (erstellt von V.M. Stucke).

Während die Proteinmenge von KIAA1741 während des Zellzyklus weitgehend unverändert blieb, konnte eine veränderte elektrophoretische Mobilität des KIAA1741 Proteins in Zellen, die mit Nocodazol in der Prometaphase arretiert wurden beobachtet werden (Abb. 26C).

Das in den Immunpräzipitationen gefundene volllängen KIAA1741 entspricht einem Protein von über 150 kDa. Da für Aurora-A hochmolekulare Substrate dieser Größe berichtet wurden (Kimura et al., 1998), lag es auf der Hand, zu fragen, ob KIAA1741 eines dieser Substrate ist. Um zu zeigen, dass Aurora-A auch in HeLa Zellen hochmolekulare Substrate phosphoryliert, wurden Kinaseassays von Aurora-A Co-Immunpräzipitationen aus mitotischen und S-Phase HeLa S3 Zellen durchgeführt. Sowohl in M- als auch I-Phase Zellen war eindeutig ein Substrat mit einem Molekulargewicht von über 200 kDa vorhanden (Abb. 27A). Interessanterweise zeigte dieses Protein, wie KIAA1741, eine veränderte elektrophoretische Mobilität in der M-Phase (Abb. 27A). Es könnte sich daher, ausgehend von der Größe des Proteins, um KIAA1741 handeln. Um als nächstes zu testen, ob KIAA1741 *in vitro* ein Substrat von Aurora-A war, wurden Kinaseassays mit dem aus 293T Zellen präzipitieren partiellen EGFP-KIAA1741 und dem volllängen myc-KIAA1741 Protein durchgeführt. Beide Proteine wurden hierbei sehr gut von Aurora-A phosphoryliert, wobei Phosphorylierung zu einer veränderten elektrophoretischen Mobilität des volllängen myc-KIAA1741 Proteins führte (Abb. 27B,C). KIAA1741 wurde nahezu gleich gut wie das exogene Substrat MBP von Aurora-A phosphoryliert (Abb. 27C). Interessanterweise war auch eine Phosphorylierung des partiellen EGFP-KIAA1741 Proteins in den Reaktionen mit der Aurora-A KD Mutante zu erkennen, wenn dieses Protein aus mitotischen Zellen immunpräzipitiert wurde (Abb. 27C, Pfeil). Diese Phosphorylierung könnte auf die an KIAA1741 gebundene Aurora-A zurückzuführen sein. Dies ist plausibel, da in Co-Immunpräzipitationen des partiellen KIAA1741 Proteins aus 293T Zellen, Aurora-A nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt).

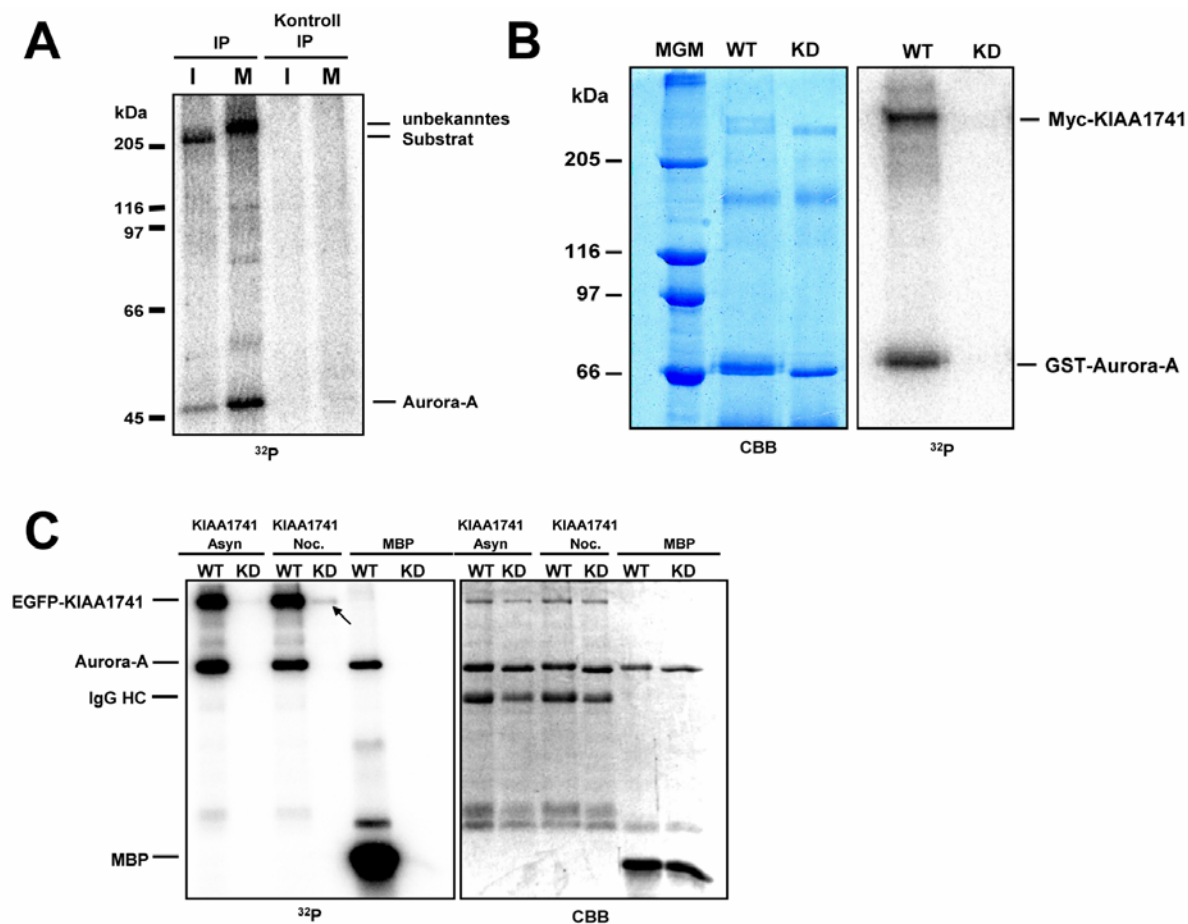


Abb. 27 : KIAA1741 ist ein Substrat von Aurora-A.

(A) Co-Immunpräzipitationen aus I- und M-Phase Extrakten von HeLa S3 Zellen mit dem Aurora-A Antikörper (IP), wurden für eine Stunde mit [γ^{32} P]-ATP inkubiert und durch SDS-PAGE aufgetrennt. Das Autoradiogramm ist gezeigt. Als Kontrolle wurden Immunpräzipitationen mit dem mit einem Überschuss an Peptid gesättigten Antikörper (Kontroll IP) durchgeführt.

(B) Vollängen myc-KIAA1741 wurde in 293T Zellen exprimiert, immunpräzipitiert und für *in vitro* Kinaseassays zusammen mit rekombinanter GST-Aurora-A WT und KD in Gegenwart von [γ^{32} P]-ATP inkubiert. Das präzipitierte Protein ist bei etwa 300 kDa zu erkennen (Beschriftung). Gezeigt ist das Coomassie BB gefärbte Gel (links) und das zugehörige Autoradiogramm (rechts).

(C) *In vitro* Kinaseassay mit dem aus 293T Zellen präzipitieren partiellen EGFP-KIAA1741 Protein mit rekombinanter Aurora-A WT beziehungsweise KD in Gegenwart von [γ^{32} P]-ATP. Autoradiogramm (links) und das korrespondierende Coomassie BB gefärbtes Gel (rechts) sind gezeigt. Als Kontrolle wurden Zellen mit dem leeren Vektor transfiziert. MBP wurde als Referenz-Substrat verwendet.

Subzelluläre Lokalisation von KIAA1741

Da die biochemischen Daten eine Bindung des volllängen KIAA1741 Proteins an Aurora-A belegten, wurde die Lokalisation von KIAA1741 in humanen Zellen mittels Expression von myc-KIAA1741-Fusionsproteinen und indirekter Immunfluoreszenz untersucht.

Das partielle EGFP-KIAA1741 Protein zeigte in U2OS Zellen eine nukleäre Lokalisation in Interphase-Zellen, wohingegen in der Mitose keine Lokalisation an subzelluläre Strukturen festgestellt werden konnte (Daten nicht gezeigt). Expression des volllängen myc-KIAA1741 Proteins zeigte, neben der bereits für das carboxyterminale Fragment beobachteten nukleären Lokalisation, eine klare Co-Lokalisation an Aktin Strukturen wie Fokalkontakte und den Zellkortex. Dies war auch in mitotischen Zellen zu erkennen, wo ein starkes Signal am Zellkortex beobachtet wurde (Daten nicht gezeigt).

Um die Lokalisation des endogenen Proteins zu bestimmen, wurden Immunfluoreszenz-Analysen mit dem affinitätsgereinigten KIAA1741 Antikörper in humanen HeLa und U2OS Zellen durchgeführt. Hierbei zeigte der Antikörper Signale an Strukturen, an welchen auch das exprimierte myc-KIAA1741 lokalisierte: In der Interphase waren Aktin-Strukturen wie Fokalkontakte und der Zellkortex gefärbt (Abb. 28A,B). Die Färbung des Zellkortex trat besonders hervor, wenn die Zellen mit Digitonin präextrahiert wurden (Abb. 28A). In der Mitose wurde ebenfalls eine Lokalisation von KIAA1741 an den Zellkortex beobachtet, auffallend war hier vor allem die Färbung der aktinreichen Teilungsfurche in der Telophase (Abb. 28B). Interessanterweise war eine schwache Co-Lokalisation von KIAA1741 mit Aurora-A an der mitotischen Spindel und den Centrosomen bei Verwendung einer Präextraktions-Fixierung zu erkennen (Abb. 28C). Um einen Fixierungsartfakt als Ursache für diese Spindellocalisation auszuschließen, wurden isolierte mitotische Spindeln aus humanen Zellen (freundlicherweise von H.H. Silljé zur Verfügung gestellt) durch Western-Blot-Analyse auf die Anwesenheit von KIAA1741 getestet. Während Aurora-A ein starkes Signal in der Spindelpräparation und ein schwaches Signal in den Überständen zeigte, konnte KIAA1741 nur in den Überständen nachgewiesen werden (Abb. 28D). Biochemisch konnte somit nicht bestätigt werden, dass KIAA1741 mit der mitotischen Spindel assoziiert. Andererseits ist es auch möglich, dass die Menge des an die Spindel gebundenen KIAA1741 Proteins unterhalb der Nachweisgrenze liegt, beziehungsweise dass es bei der Spindel-Präparation degradiert wurde.

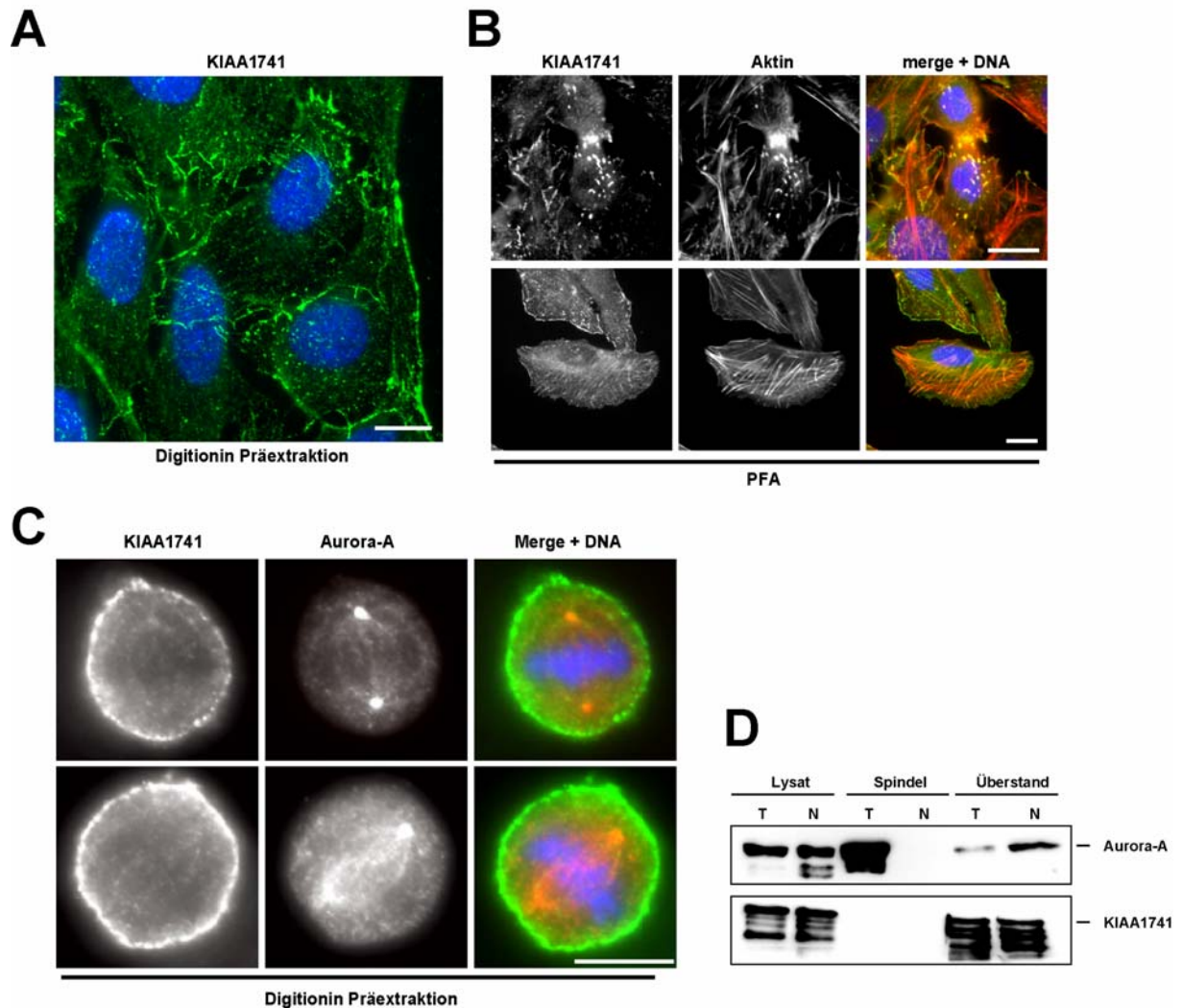


Abb. 28 : Subzelluläre Lokalisation von KIAA1741.

Indirekte Immunfluoreszenz mit dem affinitätsgereinigten KIAA1741 Antikörper an humanen U2OS Zellen. Größenbalken entsprechen 10 µm.

(A) Zellen, präextrahiert mit Digitonin und fixiert in Methanol.

(B) Zellen fixiert mit Paraformaldehyd (PFA), Co-Färbung mit Phalloidin in der Telophase (oben) und Interphase (unten).

(C) Zellen, präextrahiert mit Digitonin und fixiert mit Methanol. Co-Färbung mit dem monoklonalen Aurora-A Antikörper in der Metaphase ist gezeigt.

(D) Western-Blot-Analyse von isolierten mitotischen Spindeln und Zellextrakten. T: Taxol stabilisierte Spindeln, N: Nocodazol-Behandlung als Kontrolle. Aurora-A wurde als Spindel-Marker verwendet. Das Präzipitat („Spindel“) sowie der Überstand sind geladen.

Charakterisierung des RNAi Phänotyps von KIAA1741

Um die Funktion von KIAA1741 in humanen Zellen näher zu analysieren, wurde KIAA1741 mit Hilfe eines siRNA Duplex in HeLa S3 Zellen depletiert. Als Kontrolle wurden die Zellen mit dem Kontroll-Duplex (GL2) behandelt. Western-Blot-Analysen von Zelllysaten zeigten, dass das KIAA1741 Protein nach Behandlung der Zellen mit dem KIAA1741 spezifischen Duplex für 72 Stunden nahezu nicht mehr nachgewiesen werden konnte (Abb. 29A). Demgegenüber zeigte die Behandlung der Zellen mit der GL2 Duplex keinen Effekt auf die KIAA1741 Expression (Abb. 29A). Wie zu erwarten, war KIAA1741 in Immunfluoreszenz-Analysen dieser Zellen nicht mehr an Aktin-Strukturen zu erkennen, es konnte jedoch im Nukleus nachgewiesen werden (Abb. 29B). Dies könnte auf eine unspezifische Reaktion mit einem Antigen im Kern oder auf ein verändertes Equilibrium von KIAA1741 zwischen einer RNAi resistenteren Population im Kern zu einer RNAi anfälligen Population im Zytoplasma zurückzuführen sein. Indirekte Immunfluoreszenz-Analysen gegen α - und γ -Tubulin in den mit dem KIAA1741 Duplex behandelten Zellen zeigten keine sichtbaren Defekte in der Organisation der Mikrotubuli beziehungsweise der Centrosomen (G.Guargualini persönliche Kommunikation und Daten nicht gezeigt).

Zellen, die mit dem KIAA1741 siRNA Duplex behandelt wurden, konnten nicht mehr mit Nocodazol in der Mitose arretiert werden (Daten nicht gezeigt). Es wurde daher untersucht, ob die Depletion von KIAA1741 einen Einfluss auf das Fortschreiten im Zellzyklus hat. Hierzu wurden asynchrone Kulturen von HeLa S3 Zellen mit dem KIAA1741 beziehungsweise dem GL2 siRNA Duplex behandelt und der DNA Gehalt der Zellen nach Fixierung in Methanol nach 48 Stunden beziehungsweise 72 Stunden über LSC-Analyse bestimmt. Während die mit dem Kontroll-Duplex GL2 behandelten Zellen stets ein für eine proliferierende Kultur typisches DNA-Profil zeigten, war in den mit dem KIAA1741 Duplex behandelten Zellen nach 48 Stunden eine leichte Zunahme an apoptotischen Zellen sowie eine signifikante Abnahme an S-Phase Zellen (DNA Profil zwischen 2N und 4N) von $\sim 13\%$ auf $\sim 5\%$ zu beobachten. Konsistent mit einem zu vermutenden Block in der G₁-Phase, nahm nach 72 Stunden auch die Population an G₂-Phase Zellen (4N) signifikant ab, während die Anzahl der G₁-Phase Zellen (2N) zunahm (Abb. 29C).

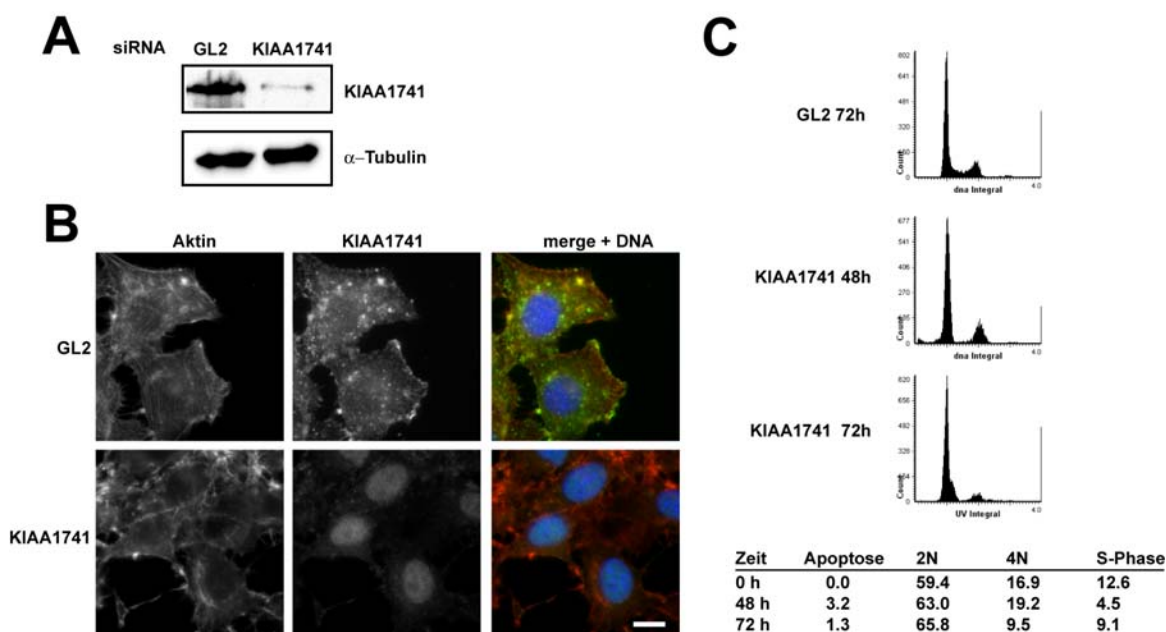


Abb. 29 : siRNA Phänotyp von KIAA1741.

(A) Western-Blot-Analyse von Zelllysaten von Zellen welche für 72 Stunden mit dem KIAA1741 Duplex, beziehungsweise einem Kontroll-Duplex (GL2) behandelt wurden. Die Filter wurden für KIAA1741 und α -Tubulin als Ladekontrolle beprobt. Als Kontrolle dienten Extrakte von Zellen, die mit der Kontroll-Duplex (GL2) behandelt wurden.

(B) HeLa S3 Zellen wurden für 72 Stunden mit dem KIAA1741 beziehungsweise dem GL2 siRNA Duplex behandelt, in PFA fixiert und KIAA1741 durch indirekte Immunfluoreszenz sowie Aktin durch Färbung dargestellt. DNA ist mit DAPI gefärbt. Der Größenbalken entspricht 10 μ m.

(C) DNA Profile einer asynchronen HeLa S3 Zellpopulation, behandelt mit dem KIAA1741 spezifischen Duplex beziehungsweise einem Kontroll Duplex (GL2). Gezeigt ist das Histogramm der LSC Analyse. Die Tabelle gibt die prozentuale Zusammensetzung der Population nach „gaten“ des Histogramms an.

Zusammenfassung

KIAA1741 wurde sowohl in Co-Immunpräzipitationen mit dem Aurora-A Antikörper als auch in Bindungsexperimenten mit rekombinanter Aurora-A Kinase mit HeLa Zellextrakten gefunden. Ferner war KIAA1741 ein sehr gutes *in vitro* Substrat von Aurora-A und zeigte nach Phosphorylierung eine veränderte elektrophoretische Mobilität. Der Carboxylterminus von KIAA1741 ist dabei sowohl für die Bindung an Aurora-A als auch für die Phosphorylierung ausreichend. Um KIAA1741 weiter zu charakterisieren, wurde ein polyklonaler Antikörper generiert, mit welchem KIAA1741 spezifisch nachgewiesen werden konnte. KIAA1741 war zellzyklusunabhängig exprimiert, zeigte jedoch eine veränderte elektrophoretische Mobilität in der M-Phase. Endogenes KIAA1741 lokalisierte in humanen Zellen an aktinreiche Strukturen. Depletion von KIAA1741 durch siRNA führte zu G₁-Arrest der Zellen.

Charakterisierung des Interaktionspartners TPX2

TPX2 konnte in den Aurora-A Co-Immunpräzipitationen als weiterer potentieller Bindungspartner der Aurora-A Kinase identifiziert werden. Diese Interaktion konnte durch Bindungsexperimente, in denen endogenes TPX2 Protein mit rekombinanter Aurora-A interagiert, bestätigt werden (siehe oben).

TPX2 ist als „targeting Faktor“ für das „Xenopus Kinesin-like-Protein 2“ (Xklp2) beschrieben (Wittmann et al., 1998). Ferner ist TPX2 essentiell für den RanGTP vermittelten Aufbau der mitotischen Spindel in *X.laevis* (Gruss et al., 2001). Da Aurora-A ebenfalls im Spindelaufbauprozess involviert ist, stellt TPX2 einen außerordentlich interessanten Kandidaten für einen Aurora-A Bindungspartner dar. Für das humane TPX2 Protein wurde wie für Aurora-A, eine Mitose spezifische Expression, sowie eine Spindellocalisation gezeigt (Heidebrecht et al., 1997).

Analyse der Aurora-A / TPX2 Interaktion

Um TPX2 als Bindungspartner von Aurora-A zu bestätigen, wurden Co-Immunpräzipitationen mit dem polyklonalen Aurora-A Antikörper wiederholt und *vice versa* mit dem TPX2 spezifischen monoklonalen Antikörper (mAK) Ki-S2 (Heidebrecht et al., 1997) durchgeführt. Wie Western-Blot-Analysen dieser Präzipitationen zeigten, konnte Aurora-A in den TPX2 Co-Immunpräzipitationen und *vice versa* TPX2 in den Aurora-A Co-Immunpräzipitationen nachgewiesen werden (Abb. 30A). Die co-präzipitierten Mengen an TPX2 beziehungsweise Aurora-A deuteten an, dass nur ein Teil von etwa 5 % des gesamten TPX2 Pools einen Komplex mit Aurora-A in der Zelle einging. Dies konnte durch Gelfiltrationsexperimente mitotischer HeLa S3 Zelllysate bestätigt werden, in denen nur eine Fraktion von Aurora-A zusammen mit TPX2 eluierte (Abb. 30B). Interessanterweise eluierte Aurora-A in zwei Komplexen, dem Hauptkomplex mit einem Molekulargewicht von etwa 80 kDa und einen weiteren Aurora-A Komplex bei etwa 2000 kDa (Abb. 30B).

Um zu testen, welche weiteren Marker zusammen mit dem hochmolekularen Aurora-A Komplex eluieren, wurden die Fraktionen der Gelfiltration mittels Western-Blot-Analyse auf das Vorhandensein von TACC3, einem Bindungspartner der centrosomalen Aurora-A (Giet et al., 2002) und KIAA1741 getestet. Wie in Abb. 30B zu sehen, konnte

sowohl TACC3 als auch KIAA1741 in diesen hochmolekularen Aurora-A positiven Fraktionen gefunden werden. Dies deutet darauf hin, dass Aurora-A *in vivo* mindestens zwei Komplexe mit verschiedenen Interaktionspartnern und eventuell unterschiedlicher Funktion und Lokalisation eingeht.

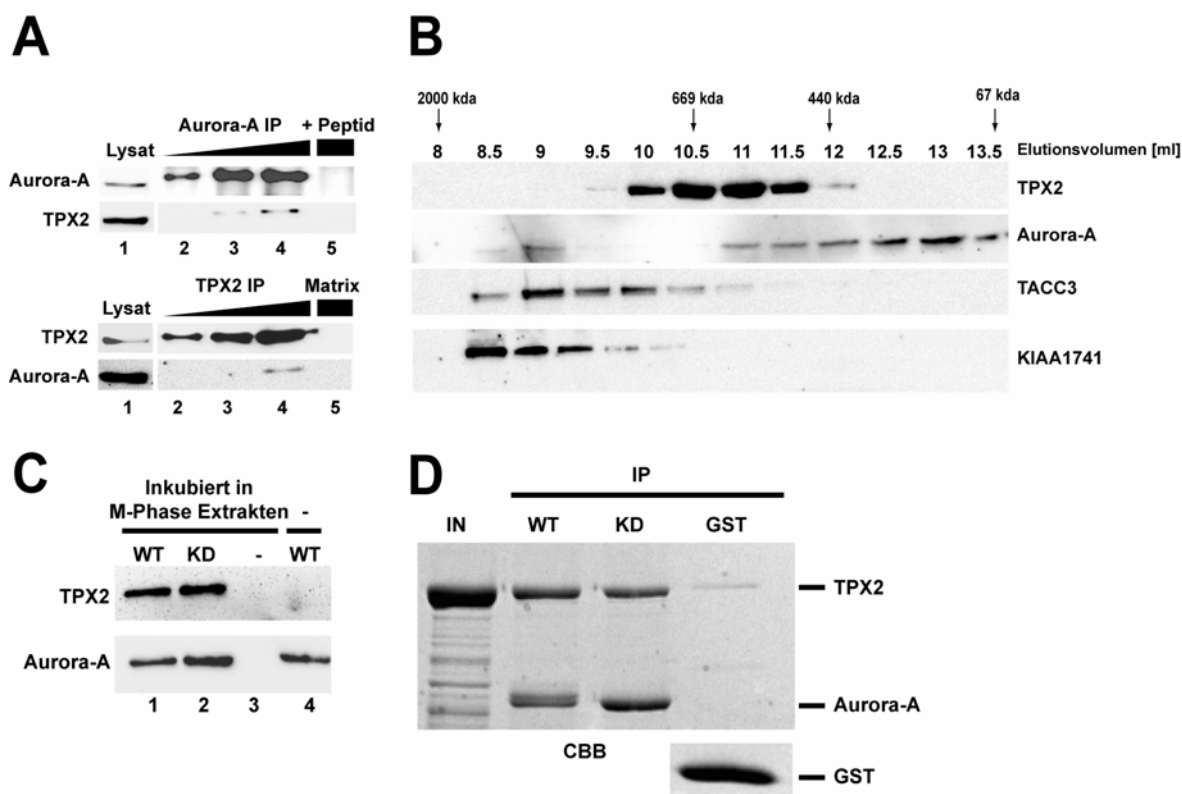


Abb. 30 : TPX2 ist ein Bindungspartner von Aurora-A.

(A) Oben: Zunehmende Mengen Aurora-A Immunpräzipitat wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Western-Blot-Analyse mit Antikörpern gegen Aurora-A und TPX2 analysiert (Spur 2-4). Die Kontroll-Immunpräzipitation wurde in Gegenwart des antigenen Peptids durchgeführt (Spur 5). Unten: Zunehmende Mengen TPX2 Immunpräzipitat wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Western-Blot-Analyse mit Antikörpern gegen Aurora-A und TPX2 analysiert (Spur 2-4). Als Kontroll-Immunpräzipitation wurde die Matrix alleine verwendet (Spur 5). Zelllysate wurden in parallel analysiert (Spur 1).

(B) Zellextrakt aus mitotischen HeLa Zellen wurde über eine Superose-12 HC 10/30 Säule fraktioniert, die gesammelten Fraktionen über SDS-PAGE aufgetrennt und durch Western-Blot-Analyse mit Antikörpern spezifisch gegen Aurora-A, TPX2, TACC3 und KIAA1741 analysiert. Pfeile zeigen das Elutions-Profil von Markerproteinen.

(C) Immobilisierte GST-Aurora-A WT und KD wurden in mitotischen HeLa Extrakten inkubiert und über Glutathion-Sepharose präzipitiert (siehe Abb. 21). Die Präzipitate wurden über PAGE aufgetrennt und durch Western-Blot-Analyse mit Aurora-A und TPX2 spezifischen Antikörpern analysiert (Spur 1 und 2). Kontrollen zeigen die Ergebnisse von Matrix, inkubiert in Extrakten (Spur 3) sowie des rekombinanten Proteins ohne Extrakt-Inkubation (Spur 4).

(D) *In vitro* Bindung von rekombinanten Protein-A-TPX2 (IN) an immobilisierte GST-Aurora-A WT und KD Proteine, beziehungsweise GST als Kontrolle. Das Coomassie BB gefärbte Gel ist gezeigt.

Nachdem verifiziert werden konnte, dass Aurora-A *in vivo* einen Komplex mit TPX2 einging, fragte ich als nächstes, ob die Kinaseaktivität für diese Bindung notwendig ist. Um dies zu testen, wurde an Glutathion-Sepharose gebundene rekombinante GST-Aurora-A WT und KD in mitotischen Extrakten inkubiert. Die GST-Aurora-A wurde präzipitiert (siehe Abb. 21) und das Präzipitat durch Western-Blot-Analyse auf TPX2 und Aurora-A analysiert. Gleiche Mengen an TPX2 waren an Aurora-A WT und KD gebunden, wohingegen keine Bindung von TPX2 an die Matrix alleine festgestellt werden konnte (Abb. 30C). TPX2 konnte ebenso nicht in der GST-Aurora-A Präparation von Sf9 Zellen nachgewiesen werden. Damit konnte gezeigt werden, dass die Kinaseaktivität von Aurora-A die Bindungsaffinität für TPX2 nicht beeinflusst. Alle bisher verwendeten Assays konnten jedoch nicht zwischen einer direkten und indirekten Bindung unterscheiden. Um dies näher zu untersuchen, wurde rekombinantes humanes TPX2 als Protein-A-Fusionsprotein sowie Aurora-A WT und KD als GST-Fusionsproteine exprimiert. TPX2 wurde zusammen mit Aurora-A WT beziehungsweise KD in Gegenwart von ATP inkubiert und GST-Aurora-A mit Glutathion-Sepharose präzipitiert. Das Präzipitat wurde gewaschen und durch SDS-PAGE gefolgt von Coomassie BB Färbung analysiert. TPX2 co-präzipitierte in nahezu äquimolaren Mengen mit der WT und der KD Form von Aurora-A, nicht jedoch mit GST, gebunden an Glutathion-Sepharose, welches als Kontrolle verwendet wurde (Abb. 30D). Aurora-A war in diesen Versuchen aktiv, wie durch Autophosphorylierung der Kinase in einem parallelen Ansatz mit [γ^{32} P]-ATP gezeigt wurde (Daten nicht gezeigt). Die Interaktion zwischen TPX2 und Aurora-A war somit direkt und nicht von der Kinaseaktivität abhängig. Erstaunlicherweise konnte die Interaktion zwischen TPX2 und Aurora-A KD sowie Fragmenten von Aurora-A nicht in einem Y2H-System etabliert werden, was erklärt, warum TPX2 nicht im oben beschriebenen Screen gefunden wurde.

Da sowohl TPX2 als auch Aurora-A einen hohen Grad an Konservierung zwischen *X.laevis* und *H.sapiens* aufweisen, wurde untersucht, ob die Interaktion zwischen Aurora-A und TPX2 auch in *X.laevis* konserviert ist. Um dies zu analysieren, wurden Co-Immunpräzipitationen mit einem polyklonalen Antikörper, der spezifisch mit der *X.laevis* Aurora-A (Eg2) reagiert (G.Guargualini), aus Oozyten-Extrakten durchgeführt. Wie für humanes TPX2 gezeigt, konnte auch aus den *X.laevis* Oozyten-Extrakten TPX2 mit Aurora-A co-immunpräzipitiert werden (Daten nicht gezeigt). Ferner konnte, analog zum menschlichen System, nur eine geringe Menge des gesamten TPX2 Pools co-präzipitiert werden, was nahe legte, dass auch in *X.laevis* nur eine Subpopulation von TPX2 eine

Interaktion mit Aurora-A eingeht (Daten nicht gezeigt). Dies zeigte, dass die Interaktion zwischen Aurora-A und TPX2 in Vertebraten evolutionär konserviert scheint.

Um die Interaktionsdomänen in TPX2 und Aurora-A zu kartieren, wurden Bindungsstudien mit *in vitro* translatierten 35 S-Methionin markierten, myc-Fusionsproteinen von Fragmenten von Aurora-A und TPX2 und rekombinaten Proteinen durchgeführt. Die verwendeten Fragmente sind schematisch in Abb. 31A visualisiert. Die volllängen Proteine zeigten, wie erwartet Interaktion, wobei eine spezifische Interaktion nur mit Aurora-A und nicht mit Aurora-B erfolgte (Abb. 31A, Daten nicht gezeigt).

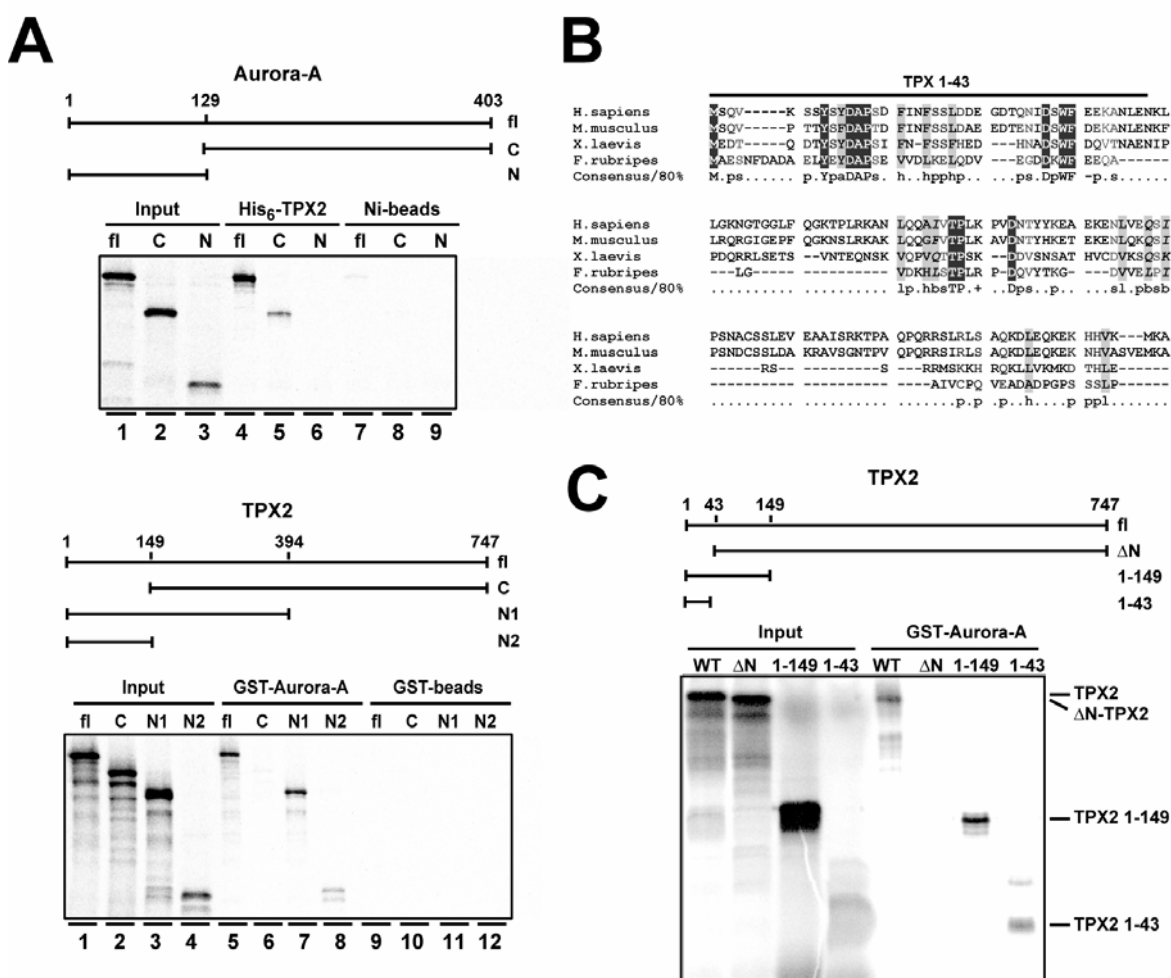


Abb. 31 : Kartierung der Interaktionsdomänen in TPX2 und Aurora-A.

(A) Fragmente von Aurora-A und TPX2, wie in den Diagrammen dargestellt, wurden durch IVT in Gegenwart von 35 S-Methionin hergestellt und die Bindung an His₆-TPX2 (oben) beziehungsweise GST-Aurora-A (unten) getestet. Protein-Komplexe wurden über Ni-Sepharose beziehungsweise Glutathion-Sepharose präzipitiert. Ni-Sepharose oder GST gesättigte Matrix wurden als Kontrolle verwendet. Die Autoradiogramme zeigen gleiche Mengen an Input und präzipitierten Protein-Komplexen.

(B) Alignment der ersten 150 Aminosäuren der TPX2 Orthologe von *H.sapiens*, *M.musculus*, *X.laevis* und *F.rubripes*. Das Alignment wurde mit CLUSTAL-W generiert.

(C) Bindung der ersten 43 Aminosäuren von TPX2 an Aurora-A. Assay wie in (A) beschrieben.

Ferner wurde eine Interaktion zwischen TPX2 und der carboxyterminalen Domäne von Aurora-A, nicht jedoch der aminoterminalen Domäne beobachtet (Abb. 31A). *Vice versa* interagierten die ersten 394 Aminosäuren von TPX2 mit Aurora-A (Abb. 31A). Eine, wenn auch schwächere, Bindung konnte ebenfalls noch mit den ersten 149 Aminosäuren von TPX2 beobachtet werden (Abb. 31A). Im Gegensatz hierzu zeigte der Carboxylterminus von TPX2 (149-747) keine Interaktion mit Aurora-A (Abb. 31A). Die katalytische Domäne von Aurora-A interagiert somit mit dem Aminoterminus von TPX2.

Ein Vergleich der aminoterminalen 149 Aminosäuren von TPX2 aus verschiedenen Vertebraten Spezies, zeigte, dass die ersten 43 Aminosäuren den höchsten Grad an evolutionärer Konservierung in dieser Sequenz aufwiesen (Abb. 31B). Interessanterweise waren hierbei die beiden Motive “YxxDAP” und “DxWF” zu 100 % zwischen *H.sapiens*, *M.musculus*, *X.laevis* und *Fugu rubripes* konserviert (Abb. 31B). Dieser Abschnitt wurde daher als potentielle Bindungsdomäne für Aurora-A getestet. In IVT-Co-Immunpräzipitationen, waren diese ersten 43 Aminosäuren von TPX2 ausreichend, um an Aurora-A zu binden (Abb. 31C). Übereinstimmend damit konnte ein TPX2 Protein, in dem die ersten 43 Aminosäuren depletiert wurden (Δ N-TPX2), nicht mehr an Aurora-A binden (Abb. 31C). Dies bestätigte, dass die ersten 43 Aminosäuren von TPX2 notwendig und ausreichend für eine Bindung an Aurora-A sind.

Phosphorylierung von TPX2 durch Aurora-A

Da TPX2 ein Phosphoprotein ist, welches spezifisch in der Mitose phosphoryliert wird (Heidebrecht et al., 1997; Wittmann et al., 2000), wurde analysiert, ob TPX2 ein Substrat von Aurora-A ist. In Kinaseassays wurde rekombinantes TPX2 *in vitro* von der WT, nicht jedoch der KD Form von Aurora-A phosphoryliert (Abb. 32A). Die Phosphorylierung war hierbei im TPX2-Protein selbst, da Protein-A nicht von Aurora-A phosphoryliert werden konnte (nicht gezeigt). Phosphoaminosäureanalysen des *in vitro* phosphorylierten TPX2 Proteins zeigten, dass die Phosphorylierung an Serin(en) erfolgte (Abb. 32A). Um potentielle Aurora-A Phosphorylierungsdomänen in TPX2 zu identifizieren, wurde das TPX2 Gen als vier, nicht überlappende Fragmente (AS 1-149, 149-394, 394-559 und 559-747) subkloniert. Die entsprechenden Peptide wurden als rekombinante his-Fusionsproteine in *E.coli* exprimiert und auf ^{32}P Inkorporation in Kinaseassays mit rekombinanter GST-Aurora-A getestet. Es zeigte sich, dass nur Fragmente, welche die ersten 149 Aminosäuren von TPX2 enthielten, von Aurora-A *in*

vitro phosphoryliert wurden (Abb. 32B oben). Um die Aurora-A Phosphorylierungsstelle(n) noch weiter einzugrenzen, wurde das TPX2 1-149 Fragment weiter subkloniert und auch die Aurora-A Bindungsdomäne von TPX2 (AS 1-43) als Substrat getestet. Interessanterweise wurde diese kurze Domäne, exprimiert als GST-Fusionsprotein, von Aurora-A phosphoryliert, wobei GST alleine kein Substrat der Kinase war (Abb. 32B unten). Um zu bestätigen, dass die *in vitro* Phosphorylierungsstelle in den ersten 43 Aminosäuren von TPX2 lag, wurde ein TPX2 Konstrukt verwendet, in dem die Aminosäuren 1-49 deletiert wurden (Δ N TPX2). Δ N TPX2 wurde nicht mehr von Aurora-A phosphoryliert (Abb. 32B unten), was zeigte, dass Aurora-A TPX2 in den ersten 43 Aminosäuren phosphoryliert. Alternativ ist jedoch nicht auszuschließen, dass Interaktion mit Aurora-A über die ersten 43 Aminosäuren von TPX2 für die Phosphorylierung von TPX2 notwendig ist.

Um zu analysieren, ob neben der Interaktion auch die Aurora-A vermittelte Phosphorylierung von TPX2 evolutionär konserviert ist, wurden Kinaseassays mit rekombinanten *X.laevis* TPX2 und Eg2 beziehungsweise humaner Aurora-A durchgeführt. *X.laevis* TPX2, exprimiert als EGFP-Fusionsprotein in *E.coli* (freundlicherweise von I.Vernos zur Verfügung gestellt), wurde sowohl von rekombinanter humaner GST-Aurora-A (Abb. 32C) als auch von *X.laevis* Eg2 phosphoryliert (Daten nicht gezeigt). Dies zeigte, dass die Aurora-A vermittelte Phosphorylierung von TPX2 evolutionär konserviert ist und lässt vermuten, dass TPX2 ein evolutionär konserviertes Aurora-A Substrat in Vertebraten ist. Interessanterweise führte die Phosphorylierung des *X.laevis* TPX2 Proteins durch Aurora-A zu einer veränderten elektrophoretischen Mobilität im Gel (Abb. 32C), wie es für *X.laevis* TPX2 in der Meiose beschrieben wurde (Wittmann et al., 2000).

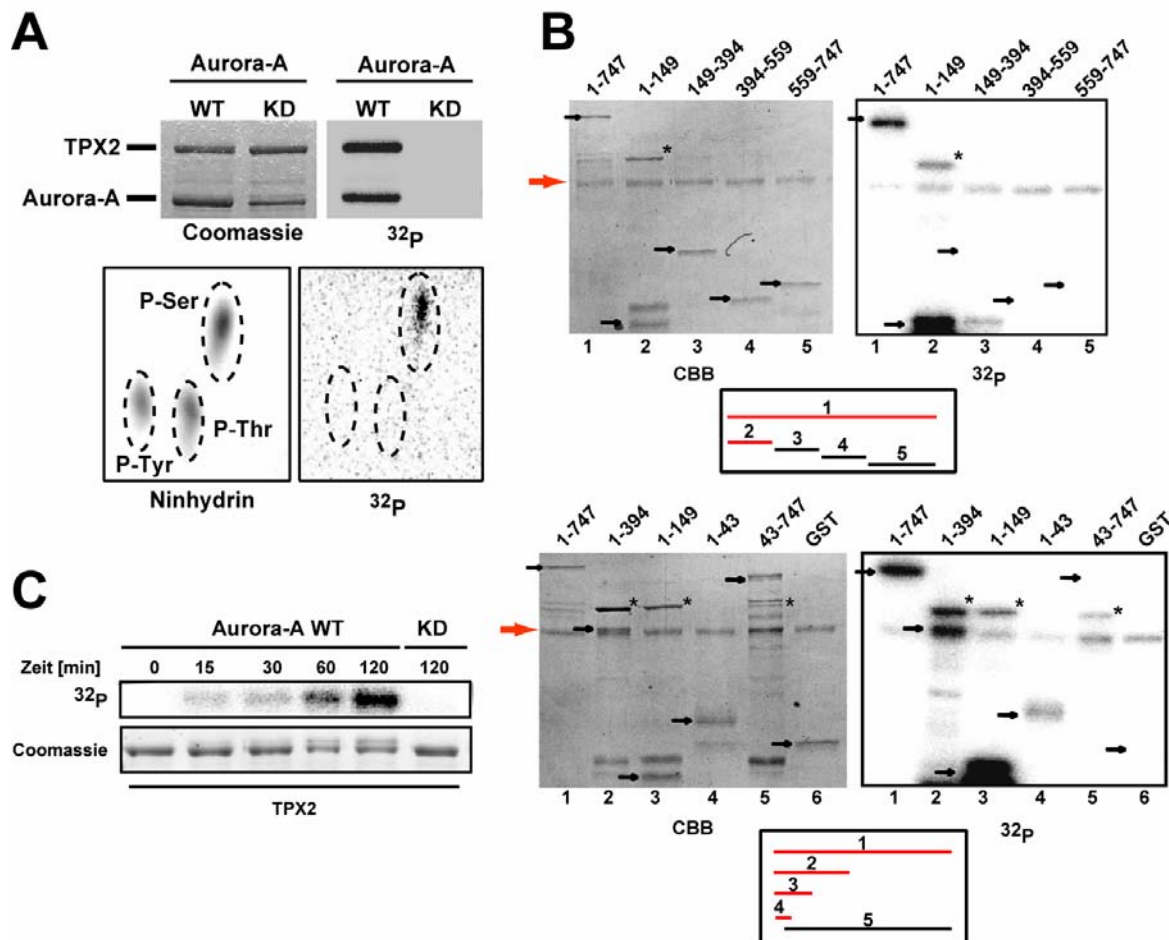


Abb. 32 : Aurora-A phosphoryliert TPX2 an Serin(en) im Aminotermminus.

(A) Ein *in vitro* Kinaseassay wurde mit rekombinanter GST-Aurora-A und rekombinanten TPX2 in der Gegenwart von $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ durchgeführt. Das Coomassie BB gefärbte Gel (links) und das Autoradiogramm (rechts) sind gezeigt. Phosphoamino säureanalyse des rekombinanten ^{32}P -markierten TPX2 Proteins (unten-rechts). Ninhydrin Färbung (unten-links) zeigt das Migrationsverhalten von Phosphoamino säure Standards.

(B) Kinaseassays mit rekombinanter Aurora-A (rote Pfeile) und rekombinant exprimierten Fragmenten von TPX2 (schwarze Pfeile) wurden in Gegenwart von $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ durchgeführt. Coomassie BB gefärbte Gele (links) und die Autoradiogramme (rechts) sind gezeigt. Die Länge der Fragmente ist in den Boxen schematisch gezeigt, rot markiert phosphorylierte Fragmente. Sterne (*) markieren phosphorylierte Verunreinigungen.

(C) Zeitlicher Verlauf eines Kinaseassays mit rekombinanten *X.laevis* EGFP-TPX2 und humaner GST-Aurora-A.

TPX2 und Aurora-A co-lokalisieren an der mitotischen Spindel

In vorausgehenden Studien wurde für TPX2 als auch für Aurora-A unabhängig voneinander eine Lokalisation an der mitotische Spindel gezeigt (Bischoff et al., 1998; Glover et al., 1995; Heidebrecht et al., 1997; Roghi et al., 1998; Schumacher et al., 1998; Wittmann et al., 2000). Um die subzelluläre Lokalisation dieser beiden Proteine in humanen Zellen im Detail zu analysieren, wurden indirekte Immunfluoreszenz-Analysen

in humanen U2OS und HeLa Zellen durchgeführt. In diesen beiden Zelltypen war eine Co-Lokalisation von TPX2 und Aurora-A am Spindelapparat, welcher positiv für α -Tubulin färbte, zu beobachten (Abb. 33A, oben). Wohingegen die Spindelpole stets stark positiv für Aurora-A waren, wurden sie nur schwach mit dem TPX2 Antikörper gefärbt (Abb. 33A, oben). Ebenso waren die Centrosomen in der G₂-Phase positiv für Aurora-A, nicht jedoch für TPX2, das in dieser Zellzyklusphase im Zellkern lokalisierte (Abb. 33A, unten). TPX2 und Aurora-A zeigten eine Co-Lokalisation an der mitotischen Spindel, wohingegen eine auffällige Lokalisation an den Centrosomen und den Spindelpolen nur für Aurora-A beobachtet wurde.

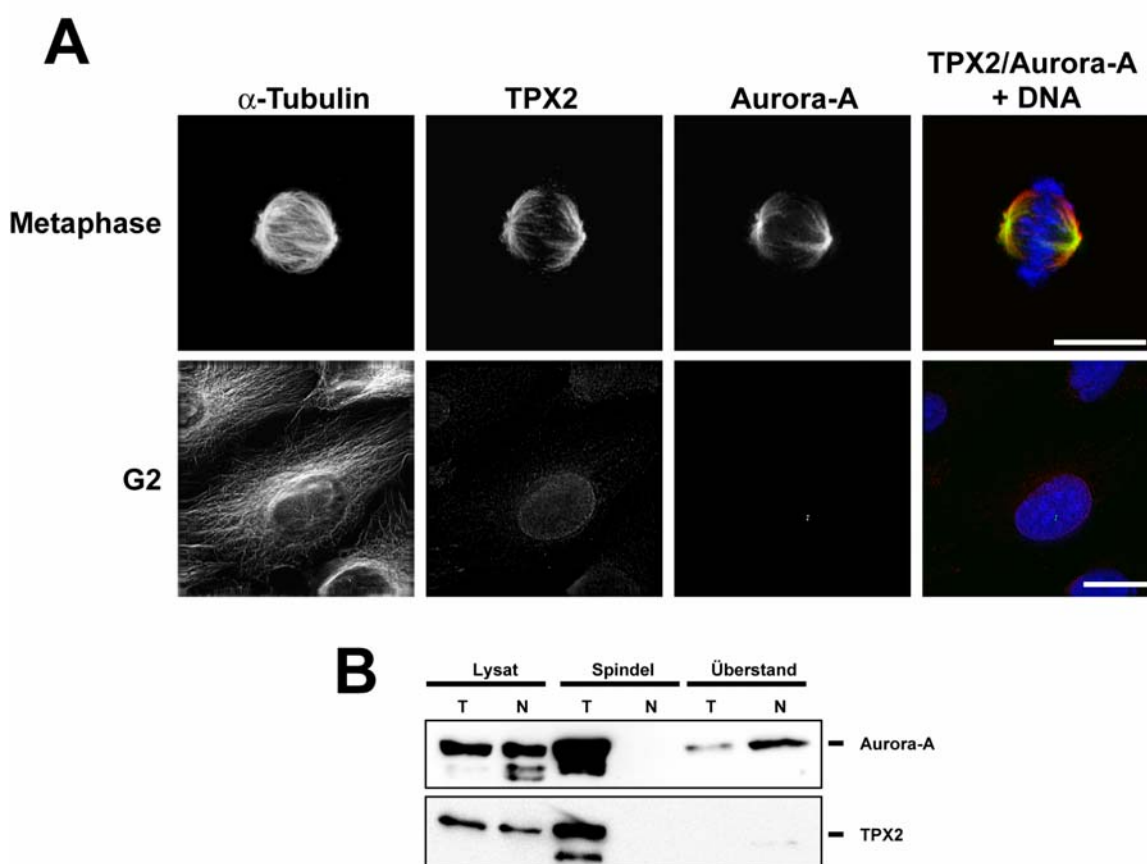


Abb. 33 : TPX2 und Aurora-A Co-Lokalisation an der mitotischen Spindel.

(A) Dekonvolutionsaufnahmen von indirekten 4-Farben Immunfluoreszenz-Analysen von HeLa S3 Zellen gefärbt für α -Tubulin, Aurora-A, TPX2 und DNA. Fusion der Bilder für TPX2 und Aurora-A mit DNA Färbung durch DAPI ist rechts gezeigt. Die obere Reihe zeigt eine repräsentative Metaphase Zelle, die unter Reihe zeigt eine repräsentative Zelle in der G₂-Phase. Größenbalken entsprechen 10 μ m.

(B) Mitotische Spindeln wurden durch Taxol (T) stabilisiert und aufgereinigt. Als Kontrolle wurde die Spindeln durch Nocodazol (N) depolymerisiert. Western-Blot-Analyse dieser Spindel Präparationen mit Aurora-A (oben) und TPX2 (unten) spezifischen Antikörpern. Zelllysate (Lysat), präparierte mitotische Spindeln (Spindel) und die Überstände der Präparation sind aufgetragen. (Spindelpräparationen wurden von H.Silljé hergestellt)

Um die Co-Lokalisation von TPX2 und Aurora-A an der Spindel zusätzlich zu bestätigen, wurden isolierte mitotische Spindeln über SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western-Blot-Analyse auf assoziiertes Aurora-A und TPX2 Protein untersucht. Während TPX2 hauptsächlich in den Spindel-Präparationen nachgewiesen werden konnte, war Aurora-A sowohl in der Spindelpräparation als auch im Zytosol nachzuweisen (Abb. 33B) (Spindelpräparationen wurden freundlicherweise von H.Silljé zur Verfügung gestellt). Diese Ergebnisse bestätigten das Vorhandensein eines zytoplasmatischen Pools von Aurora-A (Stenoien et al., 2003), während TPX2 nahezu ausschließlich an Mikrotubuli gebunden vorlag.

Um den Lokalisationsmechanismus von TPX2 in humanen Zellen zu untersuchen, wurden Fragmente von TPX2 als myc-Fusionsproteine in U2OS Zellen exprimiert. Volllängen TPX2 zeigte, wie das endogene TPX2 Protein, primär eine nukleäre Lokalisation in Interphasezellen. Höhere Expression von myc-TPX2 führte zur Dekoration der zytoplasmatischen Mikrotubuli und zur Bündelung von Mikrotubuli, ein Effekt der typisch für Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAPs) ist (Cassimeris und Spittle, 2001). In der Mitose zeigte myc-TPX2 hingegen eine Lokalisation an den Spindelapparat und die Chromosomen (Abb. 34). Das Δ N-TPX2 Konstrukt, welchem die Aurora-A Interaktionsdomäne fehlte, zeigte ein ähnliches Lokalisationsmuster wie das volllängen Protein (Abb. 34). Wie von den Depletionsstudien zu erwarten, zeigte die Deletion der Aurora-A Bindungsdomäne in TPX2 (1-43) somit keinen Einfluss auf die Lokalisierung dieses Proteins. Demgegenüber zeigten die ersten 149 Aminosäuren von TPX2, welche die Aurora-A Interaktionsdomäne enthalten, weder in Interphase- noch in M-Phase-Zellen eine spezifische subzelluläre Lokalisation (Abb. 34). Das Fehlen einer nukleären Lokalisation dieses Fragments steht im Einklang damit, dass das aktive nukleäre-Lokalisationssignal (NLS) von TPX2 (AS 315), in diesem Fragment nicht mehr enthalten ist (Schatz et al., 2003). Überraschenderweise konnte auch der Carboxylterminus von TPX2 (149-747) nicht mehr an die mitotische Spindel beziehungsweise an Interphase Mikrotubuli lokalisieren (Daten nicht gezeigt). Für die Mikrotubulibindungsaktivität von TPX2 scheinen daher Eigenschaften des volllängen Proteins notwendig zu sein. Weder mit dem 1-149 noch mit dem Δ N-Konstrukt (43-747), war nach Überexpression in U2OS Zellen, eine Kompetition mit der Lokalisation der endogenen Aurora-A an der Spindel zu erkennen (Abb. 34).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass TPX2 und Aurora-A an der mitotischen Spindel co-lokalisieren. Wohingegen TPX2 fast ausschließlich an Mikrotubuli gebunden vorlag und nicht an die Spindelpole lokalisierte, war Aurora-A hingegen auch

als zytoplasmatisches Protein vorhanden und zeigte primär eine Lokalisation an den Centrosomen in der G₂-Phase und den Spindelpolen in der Mitose. Die Lokalisation von TPX2 an Mikrotubuli scheint komplex geregelt, wobei die ersten 43 Aminosäuren für die korrekte Lokalisation des Proteins entbehrlich sind.

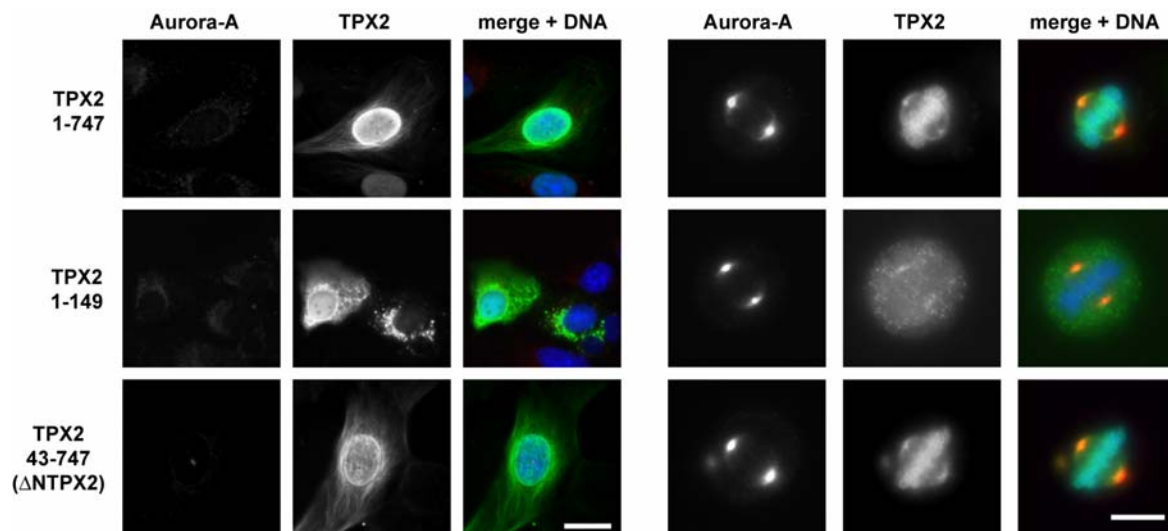


Abb. 34 : Lokalisation von exprimierten myc-TPX2 Fragmenten in humanen Zellen.

Lokalisation von TPX2 Fragmenten in U2OS Zellen. Die angegebenen Fragmente von TPX2 wurden als myc-Fusionsproteine exprimiert und durch indirekte Immunfluoreszenz in den Zellen visualisiert. Die Bilder zeigen die Färbung repräsentativer Zellen. Größenbalken entsprechen 10 μ m.

siRNA Phänotyp von TPX2

Um die Funktion von TPX2 in humanen Zellen zu untersuchen, wurde TPX2 in HeLa S3 Zellen mittels einer TPX2 spezifischen siRNA Duplex depletiert. Nach 24 Stunden konnte eine nahezu komplette Depletion des TPX2 Proteins in den Zellen erreicht werden, wie durch Western-Blot-Analysen und Immunfluoreszenz-Analysen mit einem TPX2 spezifischen Antikörper gezeigt werden konnte (Abb. 35B). Bestimmung des mitotischen Indexes durch DNA Färbung zeigte, dass die Depletion von TPX2 bereits nach 24 Stunden zu einem Arrest der Zellen in der Pro-Metaphase führte (Abb. 35C). Zu späteren Zeitpunkten (ab 36 Stunden) wurden zunehmend apoptotische Zellen beobachtet, was den Rückgang im mitotischen Index erklärt, der vermutlich auf ein Absterben der Zellen und nicht auf ein Fortschreiten in der Mitose zurückzuführen ist (Abb. 35C).

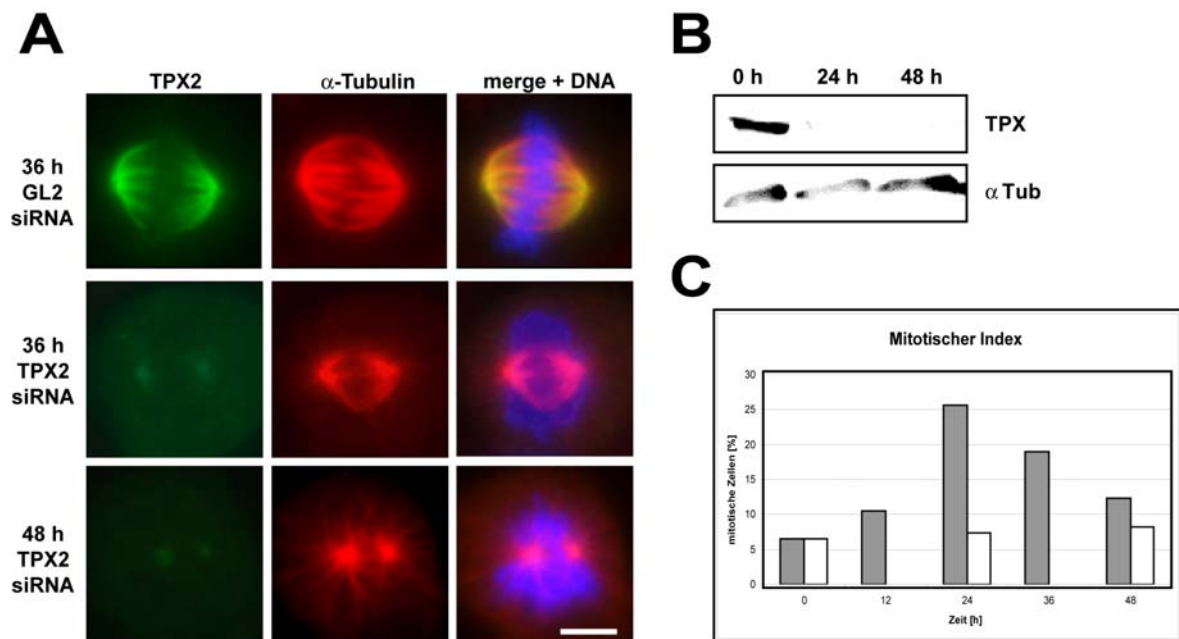


Abb. 35 : TPX2 Depletion führt zu Spindeldefekten und mitotischem Arrest in HeLa S3 Zellen.

(A) Indirekte Immunfluoreszenz-Analyse von HeLa S3 Zellen, die für 36 Stunden beziehungsweise 48 Stunden mit dem TPX2 spezifischen siRNA Duplex oder einem Kontroll-Duplex (GL2) behandelt wurden. TPX2 (links) und α -Tubulin (Mitte) sind gefärbt, die Bilder rechts zeigen Komposit Aufnahmen der beiden Färbungen zusammen mit DNA Färbung. Größenbalken entsprechen 10 μ m.

(B) Western-Blot-Analyse von Zelllysaten von HeLa S3 Zellen welche für 0 Stunden, 24 Stunden beziehungsweise 48 Stunden mit dem TPX2-spezifischen siRNA Duplex behandelt wurden. Die Filter wurden für TPX2 und α -Tubulin als Ladekontrolle beprobt.

(C) Mitotischer Index, bestimmt durch DAPI Färbung und mikroskopische Analyse von Zellen, behandelt mit dem TPX2 spezifischen Duplex (graue Balken) beziehungsweise dem Kontroll-Duplex (weiße Balken).

Färbung der mit dem TPX2 siRNA-Duplex behandelten Zellen mit einem α -Tubulin Antikörper, zeigte bereits nach 24 Stunden Defekte in der Formation der mitotischen Spindel, die sich durch ungeordnet erscheinende Spindel-Mikrotubuli äußerten (Abb. 35A). Die Ausprägung dieser Defekte nahm nach 36 Stunden deutlich zu und nach etwa 48 Stunden zeigten die meisten Zellen, in denen TPX2 in der Immunfluoreszenz nicht mehr nachweisbar war, anstatt einer Spindel zwei unabhängige Astern (Abb. 35A). Entsprechende Defekte waren in den mit dem Kontroll-Duplex (GL2) behandelten Zellen nicht zu beobachten (Abb. 35A).

Die Lokalisation von Aurora-A ist abhängig von TPX2

Um eine eventuelle gegenseitige Abhängigkeit der Lokalisation von TPX2 und Aurora-A in der Zelle zu untersuchen, wurden die beiden Proteine durch siRNA depletiert und anschließend TPX2 und Aurora-A durch indirekte Immunfluoreszenz dargestellt. Als Kontrolle wurden die Zellen mit dem Kontroll-Duplex GL2 behandelt. Um eine optimale Depletion der Zielproteine zu erreichen, wurden HeLa S3 Zellen für 72 Stunden mit dem Aurora-A Duplex beziehungsweise für 36 Stunden mit dem TPX2 Duplex behandelt. Hierdurch konnten die Proteinspiegel von TPX2 und Aurora-A zu über 90 % reduziert werden (Abb. 36D). Während Aurora-A in den Kontrollen (GL2) stets an den Spindel-Mikrotubuli lokalisierte (Abb. 36A,B und Abb. 17), war Aurora-A nach TPX2 Depletion nur noch an den Spindelpolen, nicht jedoch den Spindel-Mikrotubuli nachzuweisen (Abb. 36A). Dies ist nicht mit einer Beeinflussung der Proteinmenge an Aurora-A zu erklären, da die Menge an Aurora-A in den TPX2 depletierten Zellen, im Vergleich zur Kontrolle (GL2) sogar anstieg (Daten nicht gezeigt), wie aufgrund des durch die TPX2 Depletion induzierten Metaphasearrests zu erwarten war. Ferner zeigten die meisten dieser Zellen nach 36 Stunden eine noch weitgehend intakte mitotische Spindel (Abb. 36A). Zudem war Aurora-A auch an den Spindel Mikrotubuli zu sehen, wenn die Zellen mit dem Eg5-Inhibitor Monastrol (Mayer et al., 1999) behandelt wurden, was zur Inhibition der Spindelformation und Ausbildung von monopolaren Asten führte. Eine intakte bipolare Spindel war somit nicht für die korrekte Aurora-A Lokalisation notwendig. Dies schloss einen sekundären Effekt der TPX2 Depletion auf die Aurora-A Lokalisation aus. Diese Versuche zeigten eindeutig, dass TPX2 die humane Aurora-A Kinase an die mitotische Spindel rekrutiert.

Längere Behandlung der HeLa S3 Zellen (ab 36 Stunden) mit dem TPX2-Duplex führte ferner zur Fragmentierung der Spindelpole, wie durch Immunfluoreszenz-Analysen für Aurora-A sowie die Spindelpol-Marker NuMA und die PCM Komponente γ -Tubulin gezeigt werden konnte (Abb. 36C und Daten nicht gezeigt).

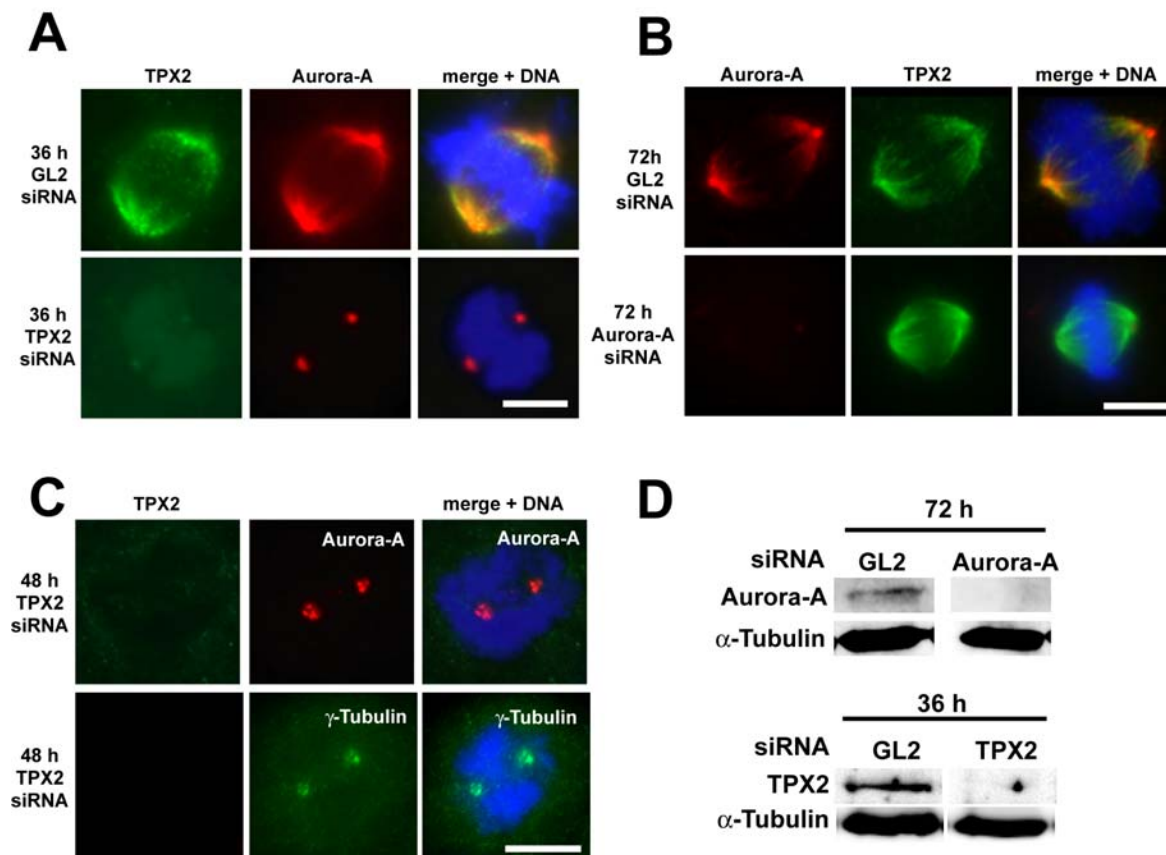


Abb. 36 : Die Lokalisation von Aurora-A ist abhängig von TPX2.

Indirekte Immunfluoreszenz von Methanol fixierten HeLa S3 Zellen. Größenbalken entsprechen 10 μ m.

(A) Die Zellen wurden für 36 Stunden mit dem TPX2 spezifischen siRNA Duplex (unten) beziehungsweise einem Kontroll-Duplex (GL2) (oben) behandelt. TPX2 (links) und Aurora-A (Mitte) sind gefärbt, die Bilder rechts zeigen Komposit-Aufnahmen der beiden Färbungen, zusammen mit DNA Färbung.

(B) Die Zellen wurden für 72 Stunden mit einer Aurora-A spezifischen siRNA Duplex (unten), beziehungsweise einer Kontroll-Duplex (GL2) (oben), behandelt. Aurora-A (links) und TPX2 (Mitte) sind gefärbt, die Bilder rechts zeigen Komposit Aufnahmen der beiden Färbungen, zusammen mit DNA Färbung.

(C) Immunfluoreszenz mit Spindelpol-Markern nach Behandlung von HeLa S3 Zellen für 48 Stunden mit der TPX2 spezifischen siRNA Duplex. Gezeigt ist die Färbung von Aurora-A, γ -Tubulin und TPX2 als Kontrolle.

(D) Western-Blot-Analyse von Zelllysaten von HeLa S3 Zellen, die für 36 Stunden mit dem TPX2-spezifischen siRNA Duplex beziehungsweise für 72 Stunden mit der Aurora-A spezifischen siRNA Duplex behandelt wurden. Membranen wurden für Aurora-A beziehungsweise TPX2 und α -Tubulin als Ladekontrolle beprobt. Als Kontrolle dienten Extrakte von Zellen, die mit der Kontroll-Duplex (GL2) behandelt wurden.

Regulation der Kinaseaktivität von Aurora-A durch TPX2

Für *X.laevis* TPX2 wurde gezeigt, dass es die Kinaseaktivität von Eg2 *in vitro* stimuliert (Tsai et al., 2003; Eysers et al., 2003). Die Rolle von Mikrotubuli als Co-Faktoren dieser Aktivierung wurde jedoch kontrovers diskutiert (Eysers et al., 2003; Tsai et al., 2003). In dieser Arbeit wurde daher untersucht, ob humanes TPX2 die humane Aurora-A Kinase aktivieren kann und wie Mikrotubuli dies beeinflussen.

Kinaseassays mit rekombinant exprimierter Aurora-A aus Sf9 Zellen und Protein-A-TPX2 aus *E.coli* wurden mit MBP als exogenem Substrat in Gegenwart von [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP durchgeführt. Um zu testen, ob Mikrotubuli einen Einfluss auf die Aktivität der Kinase zeigten wurden die Reaktionsansätze vor dem Starten der Kinasereaktion durch ATP Zugabe mit Paclitaxel stabilisierten Mikrotubuli in BRB80-Puffer inkubiert. Als Kontrolle wurde die Reaktion mit einer äquivalenten Menge an BRB80 durchgeführt. Die Kinaseaktivität wurde anhand der ^{32}P Inkorporation in MBP und der Autophosphorylierung der Kinase bestimmt. Die an Glutathion-Sepharose gebundene aktive Aurora-A Kinase konnte durch TPX2 und Mikrotubuli nur geringfügig aktiviert werden (Daten nicht gezeigt). Freie Aurora-A Kinase ohne GST, welche im Vergleich zu der an die Matrix gebundene Kinase eine sehr geringe intrinsische Kinaseaktivität zeigte, konnte jedoch durch rekombinantes TPX2 Protein aktiviert werden (Abb. 37A, Spur 1 und 2). Die Aktivierung von Aurora-A durch TPX2 wurde durch Zugabe von Paclitaxel stabilisierten Mikrotubuli um einen Faktor von etwa 6-9 erhöht (Abb. 37A, Spur 3 und 4). Um zu bestätigen, dass es sich bei dieser Aktivierung um eine Mikrotubuli spezifische Aktivität handelte, wurden Kontrollen mit der KD Aurora-A, sowie Tubulin-Dimeren durchgeführt (Abb. 37A, Spur 5 und 6). Hierbei zeigte sich, dass nur Mikrotubuli, nicht jedoch Tubulin-Dimere die Aurora-A Kinaseaktivität in Gegenwart von TPX2 steigerten (Abb. 37A). Mikroskopische Kontrolle der mit Rhodamin markierter Mikrotubuli während der Reaktion zeigte zudem, dass Mikrotubuli unter den verwendeten Bedingungen während der gesamten Reaktion als Polymere vorlagen (Abb. 37B). Interessanterweise waren Paclitaxel-stabilisierte Mikrotubuli, nicht jedoch Tubulin-Dimere, ebenfalls ausreichend, um Aurora-A in Abwesenheit von TPX2, geringfügig zu aktivieren (Abb. 37A, Spur 1 und 4). Wie für Eg2 beschrieben, war in unseren Versuchen bei der aktivierten Kinase die Autophosphorylierung an T288 von Aurora-A erhöht, wie an einer erhöhten ^{32}P Inkorporation in Aurora-A, sowie durch Verwenden eines phosphospezifischen Antikörpers gegen T288, gezeigt werden konnte (Daten nicht gezeigt).

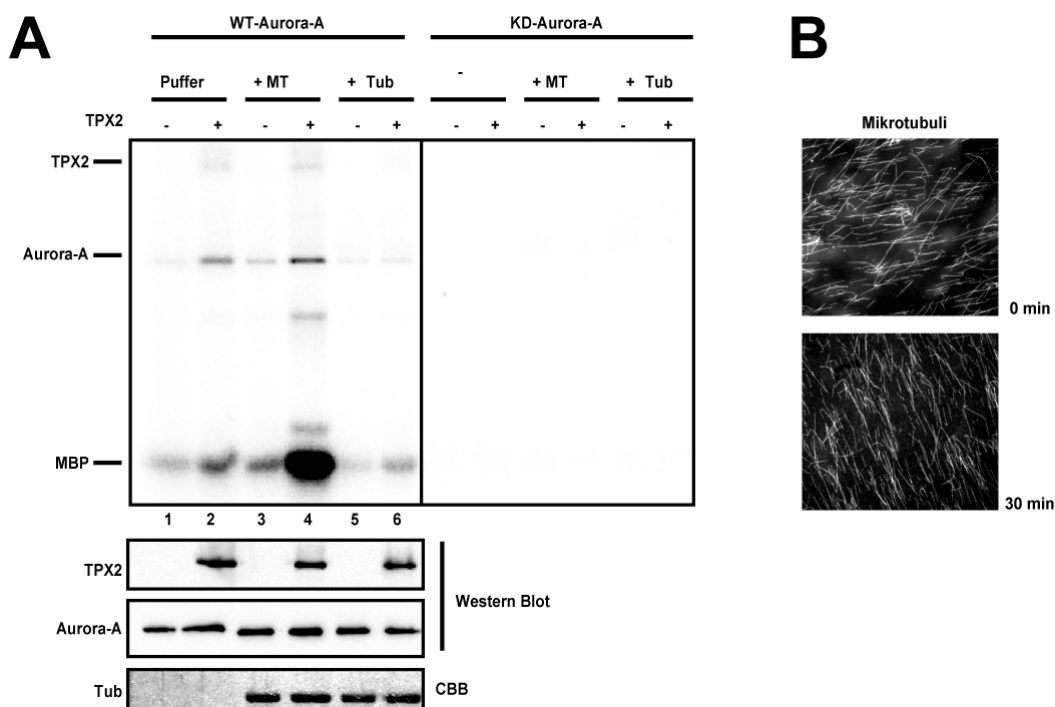


Abb. 37 : TPX2 steigert die Kinaseaktivität von Aurora-A.

(A) *In vitro* Kinaseassays wurden mit freier rekombinanter Aurora-A Kinase in Gegenwart von $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ und MBP als Substrat durchgeführt. Kinaseassays wurden mit und ohne Paclitaxel-stabilisierte Mikrotubuli durchgeführt. Rekombinantes TPX2 Protein (Spur 2,4 und 6) beziehungsweise Puffer wurde den Assays zugegeben. Als Negativ-Kontrolle wurden Tubulin-Dimere verwendet (Spur 5 und 6), beziehungsweise der Assay mit der KD Aurora-A durchgeführt (rechts). Das Autoradiogramm des Assays ist dargestellt (oben). Gleiche Mengen an eingesetzten Proteinen sind durch Western-Blot-Analyse beziehungsweise Coomassie BB Färbung gezeigt (unten).

(B) Das Vorhandensein von Mikrotubuli in den Reaktionen wurde durch mikroskopische Analyse gezeigt. Immunfluoreszenz-Aufnahmen eines Aliquots der Reaktion vor dem Starten der Kinasereaktion (oben) und zum Endpunkt (unten).

Um zu analysieren, ob eine physische Interaktion von TPX2 mit Aurora-A für den Aktivierungsmechanismus notwendig ist, wurde getestet, ob die minimale Bindungsdomäne (AS 1-43 von TPX2) beziehungsweise das $\Delta\text{N-TPX2}$ Konstrukt eine Aktivierung der Kinase bedingen. Hierzu wurden Aktivierungsassays, wie zuvor beschrieben, mit dem GST-TPX2 1-43 Fusionsprotein sowie dem $\Delta\text{N-TPX2-his}$ -Fusionsprotein (AS 43-474) und TPX2 als Kontrolle durchgeführt. TPX2 sowie das TPX2 1-43 Protein, nicht jedoch das $\Delta\text{N-TPX2}$ Protein, vermochten Aurora-A in Anwesenheit von Paclitaxel stabilisierten Mikrotubuli zu aktivieren (Abb. 38A). Um auszuschließen, dass die mit dem GST-TPX2 1-43 Protein beobachtete Aktivierung auf eine Beeinflussung durch das GST zurückzuführen ist, wurden die ersten 43 Aminosäuren von TPX2 zusätzlich als MBP-Fusionsprotein in *E.coli* exprimiert. Dieses Protein zeigte eine vergleichbare Aktivierungsaktivität wie das GST-TPX 1-43 Fusionsprotein, was einen

Einfluss des GST-Tag auf den Aktivierungsmechanismus ausschließt (Abb. 38B). Um zu analysieren, ob Mikrotubuli auch einen Einfluss auf die Aktivierung von Aurora-A durch die minimale Bindungsdomäne von TPX2 haben, wurde der Aktivierungsassay mit und ohne Zusatz von Paclitaxel stabilisierten Mikrotubuli wiederholt. Reproduzierbar konnte Aurora-A durch TPX2 und Mikrotubuli aktiviert werden. Mikrotubuli vermochten auch die Aktivierung von Aurora-A durch das MBP-TPX2 1-43 Fragment geringfügig zu stimulieren (Abb. 38B). Da die ersten 149 Aminosäuren von TPX2 in Zellen nicht an Mikrotubuli binden (Abb. 33C), könnten Mikrotubuli eventuell auch über direkte Interaktion mit Aurora-A die Aktivierung durch TPX2 beeinflussen.

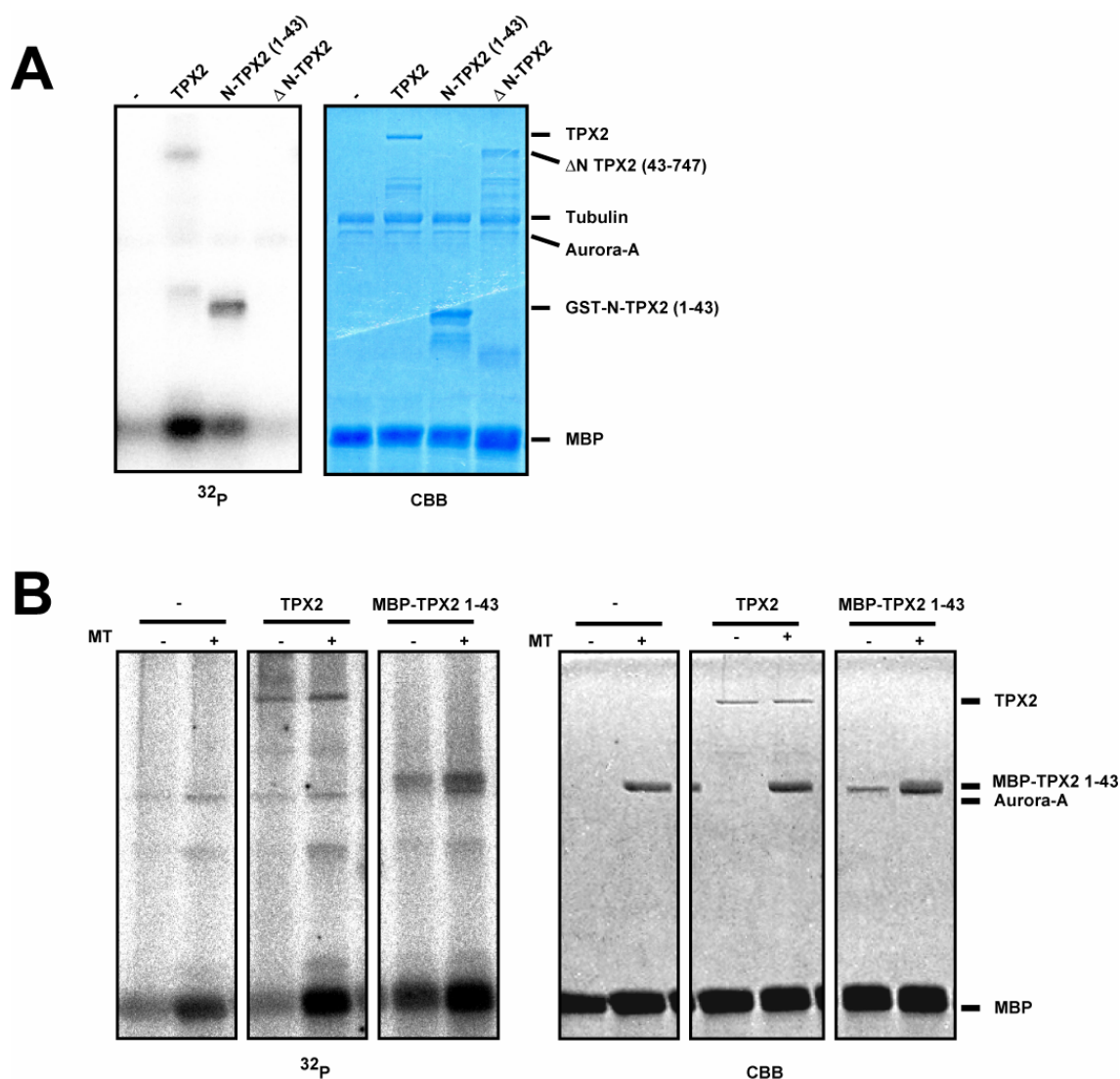


Abb. 38: TPX2 aktiviert Aurora-A über Bindung an die ersten 43 Aminosäuren von TPX2.

(A) Kinaseassay mit rekombinanter Aurora-A in Gegenwart von Mikrotubuli und MBP und verschiedenen Fragmenten von TPX2. Autoradiogramm (links) und Coomassie BB gefärbtes Gel (rechts) sind gezeigt.

(B) Autoradiogramm (links) und Coomassie gefärbtes Gel (rechts) eines Kinaseassay von Aurora-A und MBP mit volllängen TPX2 und MBP-TPX2 1-43, inkubiert mit beziehungsweise ohne Mikrotubuli.

Suche nach einem allgemeinen Aktivierungsmotiv für Aurora-A

Neben Aurora-A wird auch die zu Aurora-A nahe verwandte Aurora-B Kinase durch Wechselwirkung mit einem Bindungspartner aktiviert (Bishop und Schumacher, 2002; Honda et al., 2003). Um zu testen ob INCENP, der Aktivator der humanen Aurora-B Kinase, auch Aurora-A aktiviert, wurden Kinaseassays mit rekombinanter Aurora-A und der Aktivierungsdomäne von INCENP (AS 827-901), exprimiert als rekombinantes GST-Fusionsprotein, sowie einer Mutante (AAA) der INCENP Aktivierungsdomäne, welche Aurora-B nur schwach aktiviert, durchgeführt (Honda et al., 2003). In dieser AAA-Mutante sind drei von Aurora-B phosphorylierte Serine, die für die Aktivierung von Aurora-B durch INCENP wichtig sind, zu Alanin mutiert (Honda et al., 2003). Die Kinaseaktivität von Aurora-A wurde durch ^{32}P Inkorporation in MBP und Autophosphorylierung ermittelt. Das INCENP Peptid aktivierte die Kinaseaktivität von Aurora-A signifikant, war jedoch kein Substrat der Kinase (Abb. 39A). Überraschenderweise zeigte auch die AAA-Mutante eine Aktivierung der Kinase, die jedoch etwas geringer im Vergleich zum WT war (Abb. 39A).

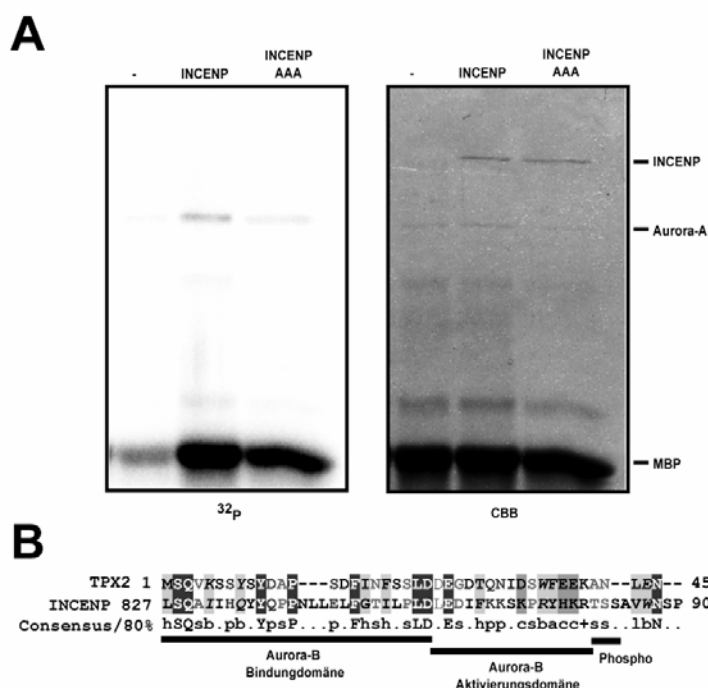


Abb. 39 : INCENP aktiviert Aurora-A und zeigt Sequenzähnlichkeiten zu TPX2.

(A) *In vitro* Kinaseassays wurden mit freier rekombinanter Aurora-A Kinase in Gegenwart von $[\gamma^{32}\text{P}]$ -ATP und MBP als Substrat durchgeführt. Zusätzlich wurde das INCENP-Aktivierungspeptid beziehungsweise eine Mutante des INCENP-Peptids (AAA) zugegeben. Das Autoradiogramm (links) und das Coomassie BB gefärbte Gel des Assays (rechts) sind gezeigt (INCENP Proteine wurden freundlicherweise von R. Honda zur Verfügung gestellt).

(B) Sequenzalignment der Aktivierungsdomäne von humanen TPX2 und INCENP. Das Alignment wurde mit CLASTAL-W generiert und mit Chroma editiert. Die charakterisierten Domänen von INCENP sind angegeben (nach Honda et al., 2003).

Dies zeigte, dass INCENP *in vitro* neben Aurora-B, auch Aurora-A aktiviert. Da die volllängen Proteine von TPX2 und INCENP keine erkennbare Homologie auf Sequenzebene zeigten, wurde eine Sequenzalignment mit der oben identifizierten Aktivierungsdomäne von TPX2 (AS 1-43) und der Aktivierungsdomäne von INCENP (AS 827-901) durchgeführt (Abb. 39B). Dieses Alignment zeigte Ähnlichkeiten und konservierte Aminosäuren in diesen beiden Domänen (Abb. 39B). Interessanterweise waren unter anderen die Aminosäurenreste Tyrosin in Position 10 und Prolin an Position 13 konserviert. Beide Aminosäuren liegen im Aurora-A/TPX2 Komplex in unmittelbarer Nähe zu Aurora-A (Bayliss et al., 2003) und Y10 ist in *X.laevis* TPX2 essentiell für die Aktivierungsaktivität (Eyers und Maller, 2003).

Suche in Prosite mit dem aus dem TPX2/INCENP-Alignment extrahierten Motiv „SQx(1,10)YxxPx(1,10)Fx(1,10)LDxE“, indem die zu 100% konservierten Aminosäuren verwendet wurden (Abb. 39B), identifiziert neben TPX2 und INCENP noch ein weiteres humanes Protein. Dieses („Serologically defined colon cancer antigen 3“ AAQ56721) war ein uncharakterisiertes Protein mit einer Myosin II Signatur im Carboxylterminus.

Trotz der geringen Sequenzhomologie scheint es plausibel, dass sowohl die INCENP- als auch die TPX2-Aurora-Aktivierungsdomäne eine gewisse Ähnlichkeit in der Sekundär- und Tertiärstruktur aufweisen. Die Kinaseaktivität von Aurora-A und -B könnten demnach über einen analogen Mechanismus reguliert werden.

Zusammenfassung

Durch Co-Immunpräzipitationen mit Aurora-A und TPX2 spezifischen Antikörpern konnte die Interaktion zwischen TPX2 und Aurora-A bestätigt werden. Bindungsstudien zeigten, dass diese Interaktion direkt ist, wobei die ersten 43 Aminosäuren von TPX2 ausreichend und notwendig sind, um mit der Kinasedomäne von Aurora-A zu interagieren. TPX2 Bindung aktivierte die Kinaseaktivität von Aurora-A in einer Mikrotubuli abhängigen Weise. Depletionsstudien über siRNA belegten zudem, dass TPX2 notwendig für die Lokalisation von Aurora-A an die Spindel-Mikrotubuli ist, wohingegen Depletion von Aurora-A keinen Einfluss auf die Lokalisation von TPX2 zeigte. Depletion von TPX2 führte ferner zu gravierenden Spindeldefekten, mitotischem Arrest und zur Fragmentierung der Spindelpole. Vergleich von TPX2 mit INCENP zeigte, dass beide Proteine Aurora-A aktivierten und deren Aktivierungsdomänen Sequenzähnlichkeiten aufwiesen.

Diskussion

Regulation von Aurora-A durch Phosphorylierung

Die Aurora-A Kinaseaktivität ist in der Mitose maximal. Dies ist die Konsequenz aus dem in dieser Zellzyklusphase hohen Proteinspiegel von Aurora-A und einer Aktivierung der Kinase. Ein wichtiger Mechanismus der Aktivierung von Aurora-A erfolgt mittels posttranslationaler Modifikation durch reversible Phosphorylierung eines konservierten Threoninrestes (T288) in der Aktivierungssignatur (T-Loop) der Kinasedomäne. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von Aurora-A durch Autophosphorylierung und Dephosphorylierung dieser Aminosäure, durch die Phosphatase PP1, reguliert wird (Katayama et al., 2001; Littlepage et al., 2002; Walter et al., 2000). Für die Aurora-A Kinase aus *X.laevis* (Eg2) wurde neben der T-Loop Aktivierungsstelle (hier T295), noch eine weitere Autophosphorylierungsstelle, ein Serin in der katalytischen Domäne (S354) kartiert, welches eventuell die Kinaseaktivität beeinflusst (Haydon et al., 2003; Littlepage et al., 2002). Ob die Kinaseaktivität von Aurora-A allein durch Autophosphorylierung oder alternativ auch durch Phosphorylierung durch regulatorische Kinasen kontrolliert wird, ist derzeit unklar. Obwohl berichtet wurde, dass die Kinaseaktivität von Aurora-A vor der Aktivierung von Cdk1 ihr Maximum erreicht (Bischoff et al., 1998), ist Cdk1 eventuell ein indirekter Regulator von Aurora-A (Maton et al., 2003; Marumoto et al., 2002). Ebenso kann die Protein-Kinase-A (PKA) Aurora-A *in vitro* direkt phosphorylieren und aktivieren (Walter et al., 2000). Evidenz für die Regulation von Aurora-A durch „upstream“ Kinasen *in vivo* ist derzeit jedoch nicht vorhanden. Die vorliegende Studie zeigte, dass die Behandlung von rekombinanter Aurora-A aus Sf9 Zellen mit dem PP1 Inhibitor „Ocadaic Acid“ (OA) zu einer veränderten elektrophoretische Mobilität der WT Form nicht jedoch der KD Form führte. Da ferner WT Aurora-A aus *E.coli* durch PP1 inaktiviert werden konnte, ergibt sich, dass Autophosphorylierung und Dephosphorylierung die Kinaseaktivität regulieren. Diese Ergebnisse bestätigten die Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen (Eyers et al., 2003; Tsai et al., 2003; Walter et al., 2000).

Als neuer Ansatz wurden die Autophosphorylierungsstellen in Aurora-A kartiert. Hierzu wurde ausgenutzt, dass WT Aurora-A *in vitro* die KD Form in trans phosphoryliert. Somit konnte gezeigt werden, dass Autophosphorylierung ausschließlich in der

Kinasedomäne (AS 124-403) und nicht in der aminoterminalen Domäne (AS 1-129) erfolgte. Phosphoaminosäureanalysen zeigten ferner, dass eine Autophosphorylierung sowohl an Threonin- als auch an Serinresten erfolgte. Eine dieser Phosphorylierungsstellen ist T288, wie die Analyse mit einem phosphospezifischen Antikörper zeigte (Daten nicht gezeigt). Als Kandidat für die Serin Autophosphorylierungsstelle(n) kommt die in *X.laevis* Aurora-A gefundenen Autophosphorylierungsstelle an S349 in Frage, die auch in der humanen Aurora-A (S342) konserviert ist (Haydon et al., 2003; Littlepage et al., 2002). Obwohl für Aurora-A *in vitro* eine trans-Autophosphorylierung gezeigt werden konnte, scheint es dennoch wahrscheinlich, dass die aktivierende Autophosphorylierung der Kinase *in vivo* durch Phosphorylierung in cis vermittelt wird, da Aurora-A *in vivo* nicht als Dimer vorliegt (Daten nicht gezeigt).

Konsistent mit den Beobachtungen von Tsai et al. (2003) und Eyers et al. (2003), zeigte auch die in dieser Arbeit verwendete bakteriell exprimierte Aurora-A Kinase eine höhere Kinaseaktivität als die aus Insekten-Zellen (Sf9) aufgereinigte, rekombinante Kinase. Die hier aufgereinigte Aurora-A Kinase aus Sf9 Zellen zeigte im Vergleich zu den Daten von Tsai et al. (2003) jedoch noch eine gewisse intrinsische Kinaseaktivität. Die verringerte Kinaseaktivität der rekombinanten Aurora-A aus Sf9 Zellen kann erklärt werden, wenn angenommen wird, dass Aurora-A einen Komplex mit Insektenzellen PP1 bildet. Diese Hypothese wird unterstützt durch die Beobachtung, dass Inkubation der Kinase bei Raumtemperatur zur Inaktivierung führte, welche durch PP1 Inhibitoren blockiert werden konnte.

An Matrix immobilisierte GST-Aurora-A zeigte demgegenüber eine höhere Aktivität als die freie Kinase. Dies könnte durch die räumliche Nähe der Aurora-A Moleküle bedingt sein. Es ist plausibel, dass hierdurch eine sterische Hinderung der PP1 Bindung stattfindet, beziehungsweise dass Aurora-A sich in trans aktiviert, wie dies *in vitro* gezeigt wurde.

Um erstmals eine Proteinmengen-unabhängige Aktivierung der humanen Aurora-A Kinase in der M-Phase zu zeigen, wurde Aurora-A als myc-Fusionsprotein in 293T Zellen überexprimiert, um die endogene Regulation der Proteinmenge zu kompensieren. Immunpräzipitation dieser Kinase aus Interphase und M-Phase Zellen zeigte, dass die Kinaseaktivität in der M-Phase deutlich höher war. Interessanterweise wurde hier auch ein M-Phase spezifisches Substrat eines Molekulargewichtes von etwa 100 kDa festgestellt. Eventuell könnte es sich hierbei um einen Mitose-spezifischen Aktivator von Aurora-A

handeln. Wie unten diskutiert, kann angenommen werden, dass es sich hierbei um TPX2 handelte.

Zusammenfassend konnte somit gezeigt werden, dass die Aurora-A Kinaseaktivität in der M-Phase unabhängig von der Proteinmenge zunimmt. Hierbei erfolgt die Regulation der Kinase nach den gegenwärtigen Befunden in erster Linie über Autophosphorylierung in der katalytischen Domäne.

Phänotyp der Aurora-A Depletion

Die *in vivo* Funktion von Aurora-A ist derzeit nicht im Detail bekannt. Um einen Einblick in die Funktion der Kinase in humanen Zellen zu erhalten, wurde Aurora-A daher durch siRNA in humanen HeLa S3 Zellen depletiert. Entsprechende Versuche wurden zuvor mit den Aurora-A Homologen aus *C.elegans* und *D.melanogaster* durchgeführt (Berdnik und Knoblich, 2002; Giet et al., 2002; Hannak et al., 2001; Schumacher et al., 1998). In dieser Arbeit wurde jedoch zum ersten Mal der Phänotyp der Depletion von Aurora-A mittels siRNA in humanen HeLa S3 Zellen analysiert.

Es wurden zwei unterschiedliche siRNA Duplexe gegen Aurora-A verwendet. Beide Duplexe vermochten den Proteinspiegel der endogenen Aurora-A in HeLa S3 Zellen spezifisch und signifikant zu reduzieren. Nach 72 Stunden konnte sogar eine nahezu vollständige Reduktion des Aurora-A Proteins unter die Nachweisgrenzen der Western-Blot-Analyse und der Immunfluoreszenz erreicht werden. Der auffälligste Phänotyp, den die so behandelten Zellen zeigten, war Apoptose. Immunfluoreszenz-Analysen zeigten ferner, dass Zellen, in denen Aurora-A nicht mehr nachzuweisen war, noch bipolare mitotische Spindeln bildeten. Es wurden jedoch leichte Defekte in der Struktur dieser Spindeln und breitere Spindelpole beobachtet. Demgegenüber schien die Behandlung einer asynchronen Kultur mit dem Aurora-A Duplex das Fortschreiten dieser Zellen im Zellzyklus nicht zu beeinflussen. Dies ist konsistent mit Beobachtungen von Katayama et al. (2004) in p53 negativen H1299 und Saos-2 Zellen.

Dass der Aufbau einer bipolaren Spindel durch Aurora-A Depletion nicht inhibiert wurde, ist im Einklang mit einer Reihe von Experimenten in verschiedenen Spezies. So bilden auch humane Kolonkarzinom- und Cervixkarzinom-Zellen (DLD-1 und HeLa) nach Behandlung mit dem Aurora-A und -B spezifischen Inhibitor ZM447439 noch eine bipolare Spindel (Ditchfield et al., 2003). Ebenso führt in *C.elegans* die Depletion von Aurora-A (AIR-1) nur zu leichten Spindeldefekten (Schumacher et al., 1998). Ähnliche

Effekte wurden in *D.melanogaster* für die *Aurora-A*³⁷ Mutante beschrieben (Berdnik und Knoblich, 2002). Die Zellen zeigen hier bipolare Spindeln mit breiteren Spindelpolen, exakt wie sie in unseren Experimenten in humanen Zellen beobachtet wurden (Berdnik und Knoblich, 2002). Demgegenüber führt ein stark hypomorphes *Aurora-A*-Allel (*Aur e209*) in einigen Zellen von *D.melanogaster* überraschenderweise zu monopolaren Spindeln mit acentrosomalen beziehungsweise multicentrosomalen Polen (Glover et al., 1995). *Aurora-A*^{e209} Embryos sind entsprechend nicht lebensfähig (Glover et al., 1995). In *Aurora-A*^{e209} sind zwei Mutationen enthalten (D47A und E212K), wovon E212 eine konservierte Stelle in der Kinasedomäne betrifft (Glover et al., 1995).

Dies zeigt, dass *Aurora-A* für die Feinregulation der mitotischen Spindel, insbesondere der Regulation der Centrosomen wichtig scheint, nicht jedoch für den Spindelaufbau generell essentiell ist. Die beobachteten Fehler im Spindelaufbau könnten auf Störungen der Regulation der Nukleationseigenschaften des Centrosoms zurückzuführen sein (Hannak et al., 2001). Die beobachteten breiten Spindelpole nach *Aurora-A* Depletion zeigen, dass *Aurora-A* zudem wichtig für die Aufrechterhaltung der Integrität der Spindelpole ist. Darüber, wie dies molekular vermittelt wird, kann derzeit nur spekuliert werden. Attraktiv erscheint jedoch die Annahme, dass hierbei in humanen Zellen das Protein TACC3 involviert ist, das durch Phosphorylierung und Interaktion mit *Aurora-A* reguliert wird (Gergely, 2002; Giet et al., 2002).

Während dem Verfassen der vorliegenden Arbeit wurde der Phänotyp der *Aurora-A* siRNA in humanen HeLa Zellen durch eine weitere Arbeitsgruppe analysiert (Hirota et al., 2003; Kunitoku et al., 2003; Marumoto et al., 2003). Es wurde in diesen Arbeiten ein zu unserem *Aurora-A* I Duplex identischer siRNA Duplex, sowie ein weiterer Duplex, der bis auf ein Nukleotid Versatz mit unserem *Aurora-A* II Duplex übereinstimmt, verwendet. In Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit erbrachten Daten wurde beschrieben, dass beide Duplexe *Aurora-A* mit gleicher Effizienz depletierten und Apoptose in den behandelten Zellen induzierten (Marumoto et al., 2003). Apoptose wurde auch in MCF7 Zellen beobachtet, die mit dem *Aurora-A* I Duplex behandelt wurden (Katayama et al., 2004). In den *Aurora-A* depletierten HeLa Zellen wurden ferner weitgehend normale bipolare mitotische Spindeln mit breiteren Spindelpolen beobachtet, was ebenfalls den hier vorgestellten Beobachtungen entspricht (Marumoto et al., 2003; Kunitoku et al., 2003). Demgegenüber führte die Injektion von *Aurora-A* Antikörpern in humanen Zellen überraschenderweise zu multipolaren Spindeln (Marumoto et al., 2003). Die *Aurora-A* depletierten Zellen zeigten zudem Defekte in der Anordnung der Chromosomen in der

Äquatorialebene, unabhängig ob die Aurora-A Funktion durch siRNA oder Antikörperinjektion inhibiert wurde (Kunitoku et al., 2003; Marumoto et al., 2003). Experimente mit synchronisierten Kulturen legen ferner nahe, dass die Zellen mit Verzögerung in die Mitose eintraten, wenn Aurora-A durch siRNA oder Antikörperinjektion inaktiviert wird (Marumoto et al., 2002; Hirota et al., 2003). Starke Defekte in der Anordnung der Chromosomen in der Äquatorialebene wurden in der hier vorliegenden Studie nicht beobachtet. Woraus diese Unterschiede resultieren, ist derzeit unklar.

Wie und warum induziert die Depletion von Aurora-A Apoptose? Eine Möglichkeit ist die Annahme einer Interaktion von Aurora-A mit der apoptotischen Maschinerie. Dies könnte zum Beispiel über PP1, welche in der Regulation der Apoptose eine Rolle spielt (Garcia et al., 2003), oder Interaktion mit p53 vermittelt werden (Chen et al., 2003). Dass der apoptotische Phänotyp der Aurora-A Depletion mit p53 im Zusammenhang steht, ist wahrscheinlich. So zeigen p53 positive, nicht jedoch p53 negative Zellen, die mit dem Aurora-A siRNA Duplex behandelt wurden, eine erhöhte Sensitivität gegenüber Cisplatin (Katayama et al., 2004). Überexpression von Aurora-A führt zu dem entgegengesetzten Effekt und schützt die Zellen vor Cisplatin induzierter Apoptose (Katayama et al., 2004, Claude Prigent, persönliche Mitteilung)

Bis jetzt ist nicht bekannt, in welcher Zellzyklusphase der Aurora-A Verlust Apoptose induziert. Dies könnte durch Echtzeit-Zellbeobachtungen analysiert werden. Hiermit sollte sich auch klären lassen, ob die von Hirota und Mitarbeitern beobachtete Störung der Metaphasenplatten Anordnung der Chromosomen auch mit unseren Reagenzien zu beobachten sind und ob diese eventuell mit der Induktion von Apoptose in Zusammenhang stehen (Kunitoku et al., 2003; Marumoto et al., 2003).

Methoden zur Identifikation neuer Aurora-A Bindungspartner

Bindungspartner der humanen Aurora-A Kinase wurden in dieser Arbeit durch komplementierende biochemische Methoden identifiziert. Hierzu wurden Yeast-Two-Hybrid Screening, Co-Immunpräzipitation und Bindungsexperimente mit rekombinanten Protein verwendet. Mittels Yeast-Two-Hybrid Screening konnte ein neuer Aurora-A Interaktions-Kandidat isoliert werden. Interessanterweise handelte es sich hierbei um ein SH3-Domänen Protein. Aurora-A zeigt ein P-x-x-P Motiv (AS 103-106) und kommt somit als SH3 Bindungspartner prinzipiell in Betracht. Zudem wurde kürzlich eine Interaktion

der Kinasedomäne von Aurora-A mit der SH3-Domäne von RasGAP im Y2H-System berichtet (Gigoux et al., 2002).

Die Bindung zwischen Aurora-A und dem Y2H-Kandidaten konnte durch IVT Co-Immunpräzipitation, nicht jedoch in Immunpräzipitationen aus Zelllysaten, bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Das partielle Konstrukt zeigte zudem keine Co-Lokalisation mit Aurora-A in Zellen. Ob dieses Protein daher ein Bindungspartner der humanen Aurora-A Kinase *in vivo* ist, muss durch weiterführende Versuche unter Verwendung des volllängen Proteins analysiert werden.

Der erfolgreichste Ansatz zur Identifikation neuer Bindungspartner von Aurora-A war die Co-Immunpräzipitation endogener Aurora-A mit Komplexpartnern. Die Interaktion von drei hierdurch identifizierten Proteinen, KIAA1007, KIAA1741 und TPX2, konnte durch Bindungsstudien mit rekombinanten Proteinen bestätigt werden. Diese Proteine wurden daher näher charakterisiert. Zwei dieser Proteine, KIAA1741 und TPX2, waren zudem *in vitro* Substrate von Aurora-A.

KIAA1007 ist ein potentieller Bindungspartner von Aurora-A

Die Interaktion von KIAA1007 mit Aurora-A konnte durch Co-Immunpräzipitation des exprimierten carboxyterminalen Teils von KIAA1007 in 293T Zellen bestätigt werden. Zusätzlich zeigte dieses partielle KIAA1007 Protein eine Anreicherung an den Aurora-A positiven Centrosomen in der G₂-Phase. Da das Startcodon des KIAA1007 Gens derzeit nicht bekannt ist, konnte das volllängen Protein nicht analysiert werden. Der carboxyterminale Teil von KIAA1007 wurde von Aurora-A *in vitro* nicht signifikant phosphoryliert. Da es sich bei dem hier untersuchten Protein nicht um das volllängen Protein handelt, welches in den Immunpräzipitationen gefunden wurde, ist es jedoch durchaus möglich, dass das volllängen Protein ein Substrat darstellt. Da das KIAA1007 Protein derzeit nicht charakterisiert ist und es zudem keine deutlich Co-Lokalisation mit mitotischen Strukturen zeigte, wurde es in der vorliegenden Studie nicht weiter im Detail analysiert. Weiterführende Experimente sind nötig, um die volllängen KIAA1007 cDNA zu klonieren und zu klären, wie KIAA1007 mit Aurora-A interagiert und welche Funktion es in humanen Zellen hat. Dies könnte sich jedoch schwierig gestalten, da in KIAA1007 keine bekannten Domänen identifiziert wurden und die zu KIAA1007 homologen Proteine in *C.elegans* und *D.melanogaster* ebenfalls noch nicht charakterisiert wurden.

KIAA1741 ist ein neuer Aurora-A Bindungspartner und ein Substrat

KIAA1741 wurde aus mitotischen Zellen als Komplex mit Aurora-A isoliert. Es ist ein Protein mit sehr großem Molekulargewicht (182 kDa). Suche in nicht redundanten Datenbanken mit BLAST und PSI-BLAST (Altschul et al., 1990; Altschul et al., 1997) konnte keine konservierten Domänen identifizieren. Proteine mit signifikanter Homologie zu KIAA1741 sind jedoch in *Mus musculus* (59 % Identität) und *Rattus norvegicus* (62 % Identität) zu finden. Dies deutet an, dass KIAA1741 eine wichtige Funktion in Säugetieren hat. Während der Durchführung der vorliegenden Arbeit wurde KIAA1741 als Interaktionspartner der humanen Tankyrase 1, einer Poly(ADP-Ribose)-Polymerase, identifiziert und entsprechend auch als TAB182 (Tankyrase-binding Protein of 182 kDa) bezeichnet (Seimiya und Smith, 2002). Die Interaktion zwischen Aurora-A und KIAA1741 konnte durch Bindung von endogenem KIAA1741 Protein an rekombinante GST-Aurora-A bestätigt werden, wobei die Affinität von KIAA1741 für die WT Kinase in der Mitose höher war als für die inaktive Kinase.

Depletion von KIAA1741 durch siRNA in humanen HeLa S3 Zellen führte zu einem Arrest der Zellen in der G₁-Phase, wohingegen der Verlauf der Mitose nicht gestört schien. Wie und ob dies mit Aurora-A in Zusammenhang steht, wird in weiterführenden Arbeiten zu klären sein. Interessant in diesem Zusammenhang ist, dass Zellen, denen die Centrosomen entfernt wurden, ebenfalls in der G₁-Phase arretieren, dies jedoch abhängig vom p53 Status der Zelle ist (Khodjakov und Rieder, 2001).

KIAA1741 wurde zudem als Substrat von Aurora-A identifiziert. *In vitro* wurde das Protein von rekombinanter Aurora-A mit nahezu gleicher Effizienz wie das exogene Substrat Myelin-basisches-Protein (MBP) phosphoryliert. Es stellt nach meinem Wissen das beste derzeit bekannte Substrat der humanen Aurora-A Kinase dar. Die *in vitro* Phosphorylierung von KIAA1741 führte zu einer veränderten elektrophoretischen Mobilität des Proteins, wie sie auch für das endogene Protein in mitotischen Zellextrakten beobachtet wurde. Es wurde beschrieben, dass Aurora-A hochmolekulare Substrate phosphoryliert (Kimura et al., 1998). Aufgrund des hohen Molekulargewichtes von KIAA1741 (182 kDa) scheint es einem dieser Substrate zu entsprechen. Hierfür spricht zudem, dass in Kinaseassays von Co-Immunpräzipitationen endogener Aurora-A ein Substrat dieser Größe zu erkennen war. Die Aurora-A Interaktion und Phosphorylierungsdomäne in KIAA1741 scheint im carboxyterminalen Teil des Proteins

zu liegen, da dieser Teil des Proteins ausreichend für die Interaktion war und von Aurora-A *in vitro* phosphoryliert wurde.

Seimiya und Smith (2002) konnten zeigen, dass die humane Tankyrase 1 ebenfalls an den Carboxylterminus von KIAA1741 bindet. Ferner kann Tankyrase 1 KIAA1741 *in vitro* polyribosylieren (Seimiya und Smith, 2002). Hieraus ergibt sich die interessante Möglichkeit, dass Aurora-A durch Phosphorylierung und/oder Bindung an KIAA1741 die Interaktion von KIAA1741 mit der humanen Tankyrase regulieren könnte.

Die humane Tankyrase 1 ist sowohl an den Telomeren, den Kernporen als auch an den Centrosomen nachzuweisen (Smith und de Lange, 1999). Die genaue zelluläre Funktion der Tankyrase 1 ist derzeit jedoch unklar. Tankyrase 1 bindet ein evolutionär konserviertes Motiv in KIAA1741 (RxxPDG), das in einer Reihe weiterer Proteine zu finden ist (Sbodio und Chi, 2002). Interessanterweise enthält auch das Spindelprotein NuMA dieses Tankyrase 1-Bindungsmotif. Durch Y2H und Co-Immunpräzipitation von überexprimierten Proteinen konnte experimentell eine physische Interaktion zwischen dem Carboxylterminus von NuMA und der Tankyrase 1 bestätigt werden (Sbodio und Chi, 2002). Da NuMA eine zentrale Rolle in der Organisation der Spindelpole spielt und hier mit der Tankyrase 1 co-lokalisiert (Blagden und Glover, 2003; Zeng, 2000), scheint es plausibel, dass die humane Tankyrase 1 und deren Bindungspartner KIAA1741 eine Funktion in der Mitose haben.

KIAA1741 lokalisierte in humanen HeLa und U2OS Zellen an Aktinstrukturen wie den Zellkortex, Fokalkontakte und die Stressfasern. Dies konnte durch Expression von rekombinantem GFP-Fusionsprotein als auch über Immunfluoreszenz-Analysen des endogenen Proteins durch zwei verschiedene Antikörper bestätigt wurde. Während der von Seimiya et al. (2002) verwendete KIAA1741-Antikörper das Protein auch an Chromosomen mitotischer HeLa Zellen erkannte, zeigte der in der vorliegenden Studie hergestellte Antikörper dort kein starkes Signal. Obwohl in Immunfluoreszenz-Analysen eine geringe Menge an KIAA1741 mit der Spindel assoziiert war, konnte eine Co-Lokalisation von Aurora-A und KIAA1741 an der mitotischen Spindel biochemisch nicht bestätigt werden. Dies könnte auf eine zu geringe Menge von KIAA1741 an der Spindel zurückzuführen sein, die in den Western-Blot-Analysen unter der Nachweisgrenze lag.

Dass Aurora-A in der Regulation von Aktin-abhängigen Prozessen, in diesem Falle der Regulation von KIAA1741, involviert ist, ist durchaus wahrscheinlich. Studien in *C.elegans* und *D.melanogaster* belegen eine Rolle von Aurora-A in Aktin-abhängigen Prozessen (Berdnik und Knoblich, 2002; Schumacher et al., 1998). So ist die Lokalisation

von Entwicklungsdeterminanten, wie den P-Granula und Pie-1 in *C.elegans*, sowie dem Protein Numb in speziellen Vorläuferzellen (sensory organ precursors = SOP) von *D.melanogaster* abhängig von funktioneller Aurora-A (Berdnik und Knoblich, 2002; Schumacher et al., 1998). Die Lokalisation dieser Determinanten zu Beginn der Mitose ist hierbei für die asymmetrische Zellteilung und Zelldifferenzierung notwendig (Gonzalez, 2002). Es wurde vorgeschlagen, dass in *D.melanogaster* ein zytoplasmatischer Pool von Aurora-A für die Lokalisation von Numb und die Regulation von Aktin-abhängigen Prozessen verantwortlich ist, wohingegen der centrosomale Pool von Aurora-A Mikrotubuli-abhängige Prozesse reguliert (Gonzalez, 2002; Berdnik und Knoblich, 2002). Da die humane Aurora-A Kinase eine ähnliche Lokalisations-Dynamik zeigt (Stenoien et al., 2003), ist es plausibel, dass auch die humane Aurora-A Kinase Funktionen im Zytoplasma hat. KIAA1741 ist somit ein durchaus interessanter Kandidat für ein durch Aurora-A reguliertes zytoplasmatisches Protein in humanen Zellen.

Die Wechselwirkung von Aurora-A und TPX2

TPX2 wurde durch Aurora-A Co-Immunpräzipitationen aus mitotischen HeLa S3 Zellen als Bindungspartner von Aurora-A identifiziert. Bindungsexperimente mit rekombinanten Proteinen bestätigen diese Interaktion und zeigen ferner, dass Aurora-A direkt an TPX2 bindet, unabhängig von der Kinaseaktivität von Aurora-A. Um ein besseres Verständnis dieser Interaktion zu erlangen, wurden die Interaktionsdomänen der beiden Proteine bestimmt: die Kinasedomäne von Aurora-A (AS 129-403) interagiert mit den ersten 43 Aminosäuren von TPX2, die in allen TPX2 homologen Proteinen einen hohen Grad an evolutionärer Konservierung aufweisen. Interessanterweise ist TPX2 nicht nur ein essentieller Bestandteil der mitotischen Spindel (Wittmann et al., 2000), sondern auch ein wichtiger Regulator des Spindel-Aufbau-Prozesses, wobei TPX2 durch die GTPase Ran reguliert wird (Gruss et al., 2001). Nach dem gegenwärtigen Modell, das in *X.laevis* Oozyten-Extrakten etabliert wurde, führt die GTP Form von Ran zur Freisetzung von TPX2 von einem inhibitorischen Komplex mit den nukleären Importfaktoren Importin α/β (Gruss et al., 2001). Die Bindung von Importin α/β an TPX2 reguliert die Mikrotubuli-Nukleationsaktivität von TPX2 (Gruss et al., 2001; Schatz et al., 2003), sowie die Interaktion mit Aurora-A (Tsai et al., 2003; Trieselmann et al., 2003). Western-Blot-Analysen von Co-Immunpräzipitationen und Gelfiltrationen zeigten, dass nur eine

Subpopulation von TPX2 und Aurora-A in der Mitose als Komplex vorlagen. Da Aurora-A nicht mit an Importin α/β gebundenem TPX2 interagieren kann (Tsai et al., 2003; Trieselmann et al., 2003), könnte dies erklären, warum in den biochemischen Analysen nur eine geringe Menge des TPX2 Proteins mit Aurora-A als Komplex vorlag. *Vice versa* liegt Aurora-A als Mikrotubuli-gebundenes Protein und als lösliches zytoplasmatisches Protein in der Zelle vor (Stenoi et al., 2003). TPX2 und Aurora-A co-lokalisieren nur an Spindel-Mikrotubuli und interagieren vermutlich auch nur dort miteinander. Dies erklärt andererseits, warum nicht die Mehrzahl der Aurora-A Moleküle in der Zelle mit TPX2 interagierten.

Die hier erbrachten Daten beweisen, dass TPX2 ein direkter Bindungspartner der humanen Aurora-A Kinase ist. Zwei weitere Arbeitsgruppen konnten dies in *X.laevis* bestätigen. Tsai et al. (2003) konnten belegen, dass TPX2 durch RanGTP von der Importin α/β Interaktion freigesetzt wird und so die Aurora-A Aktivität stimuliert. Unabhängig davon wurde TPX2 in einem klassischen biochemischen Screen durch chromatographische Fraktionierung von *X.laevis* Oozyten-Zellextrakten als Aktivator der Kinase identifiziert (Eyers et al., 2003). Beide Arbeitsgruppen schlagen ein Modell für den Mechanismus dieser Aktivierung vor. Ausgehend von der Regulation der Aurora-A Kinaseaktivität durch Phosphorylierung von T288 konnten sie zeigen, dass eine Interaktion mit TPX2 antagonistisch die Dephosphorylierung von Aurora-A durch PP1 inhibiert (Eyers et al., 2003; Tsai et al., 2003). Funktionelle Studien in *X.laevis* Oozyten-Extrakten zeigen zudem, dass der Spindelaufbau durch Zugabe einer mutierten Aurora-A Kinase (Eg2^{T295A}), in welcher die T-loop Phosphorylierungsstelle durch eine nicht phosphorylierbare Aminosäure ersetzt wurde, stark beeinträchtigt wird (Tsai et al., 2003).

Wohingegen Tsai et al. (2003) zeigen, dass Mikrotubuli für die Aktivierung der Kinase essentiell sind, belegen die Daten von Eyers et al. (2003), dass Mikrotubuli für die Aktivierung der Aurora-A Kinaseaktivität nicht notwendig sind. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Diskrepanz aufgegriffen und zudem untersucht, ob auch humanes TPX2 die humane Aurora-A Kinase aktiviert. Es konnte gezeigt werden, dass TPX2 die humane Aurora-A Kinase aktivierte und Mikrotubuli als Co-Faktoren die TPX2 vermittelte Aktivierung deutlich steigerten. Die hierfür verantwortliche Aktivierungsdomäne in TPX2 konnte kartiert werden. Kinaseassays mit rekombinanten Proteinen bewiesen, dass diese mit der Aurora-A Bindedomäne von TPX2 (Aminosäure 1-43) identisch war und ausreichend und notwendig für die Aktivierung der Kinase ist. Dies wurde bestätigt, indem gezeigt wurde, dass konservierte Tyrosine (Y8 und Y10) in dieser Domäne, die in

unmittelbaren Kontakt zu Aurora-A treten, für die Bindung und Aktivierung von Aurora-A essentiell sind (Bayliss et al., 2003; Eysers und Maller, 2003).

Es bleibt zu klären, ob Mikrotubuli die Aktivierung der Kinase über Bindung an TPX2 oder über Bindung an Aurora-A selbst vermitteln. Dass Mikrotubuli an Aurora-A wirken, ist nicht ausgeschlossen, da Aurora-A *in vitro* an Mikrotubuli bindet (Roghi et al., 1998). Zudem wurde eine geringe Steigerung der Kinaseaktivität von Aurora-A durch Mikrotubuli beobachtet. Eine Beeinflussung der Kinaseaktivität mitotischer Kinasen durch Mikrotubuli ist zudem auch für Plk1 gezeigt worden (Neef et al., 2003). Mikrotubuli dienen somit eventuell als Co-Faktoren für ein breiteres Spektrum an mitotischen Kinasen.

Wie die Bindung von Aurora-A an TPX2 die Kinaseaktivität im Detail beeinflusst, konnte kürzlich durch eine Strukturstudie geklärt werden. Bayliss et al. (2003) zeigen, dass die Bindung des aminoterminalen TPX2 Peptides (AS 1-43) an die Kinasedomäne von Aurora-A die Konformation der Aktivierungsstelle im T-loop (T288) beeinflusst. Threonin-288 liegt normalerweise an der Außenseite des Aurora-A Proteins und ist so für PP1 zugänglich. Die Bindung des TPX2 Peptides an Aurora-A führt zur Reorientierung von T288 nach innen, was T288 vor Dephosphorylierung durch PP1 schützt und die Kinase in der aktiven Form hält (Bayliss et al., 2003). Dieser Mechanismus zeigt eine gewisse Ähnlichkeit zu den lokalen Veränderungen in der Aktivierung der cAMP-abhängigen Kinase (PKA), ist jedoch fundamental unterschiedlich zur Aktivierung der Cyclin-abhängigen Kinasen (Cdks) (Bayliss et al., 2003). Im Falle der Cdks induziert die Bindung der Cycline eine größere strukturelle Veränderung im aminoterminalen Lobus der Kinasedomäne (Morgan, 1997). Die PP1 Bindungsstellen in Aurora-A wurden in einer vorausgehenden Studie ermittelt (Katayama et al., 2001). Interessanterweise korreliert eine dieser Stellen (162-165) mit der Bindungsstelle für TPX2, was auch erklärt, warum die TPX2 Bindung an Aurora-A die PP1 Bindung kompetiert. Kürzlich wurde gezeigt, dass TPX2 auch die inhibitorische Wirkung von p53 auf Aurora-A in einer ähnlichen kompetitiven Weise hemmen kann (Chen et al., 2002; Eysers und Maller, 2003).

Modellierungen der humanen Aurora-B Kinase lassen vermuten, dass deren Struktur eine starke Ähnlichkeit zu Aurora-A zeigt. Da Aurora-B durch Bindung an das Protein INCENP aktiviert wird (Bishop und Schumacher, 2002; Honda et al., 2003), ist es interessant zu fragen, ob die beiden paralogen Aurora Kinasen eventuell über einen ähnlichen Mechanismus aktiviert werden. Dies ist nahe liegend, da INCENP *in vitro* neben Aurora-B auch Aurora-A aktivierte. Im Unterschied zu Aurora-B scheint jedoch die Phosphorylierung des Aktivators für die Aktivierung der Aurora-A Kinase nicht essentiell

zu sein. So war INCENP weder ein Substrat von Aurora-A, noch verhinderte eine nicht-phosphorylierbare Mutante von INCENP die Aktivierung der Kinase. Demgegenüber ist die Phosphorylierung von INCENP durch Aurora-B für die volle Aktivierung von Aurora-B notwendig (Honda et al., 2003). Obwohl in der Primärstruktur keine klaren Homologien zwischen TPX2 und INCENP erkennbar sind, zeigte ein Alignment der Aurora-B Bindungs- und Aktivierungsdomäne von INCENP (AS 827-901) mit der Aurora-A Aktivierungsdomäne von TPX2 (AS 1-43) gewisse Gemeinsamkeiten auf (Abb. 40). Da einige der ähnlichen und identischen Aminosäuren in der Domäne des humanen TPX2 Proteins auch in TPX2 Orthologen aus anderen Vertebraten konserviert sind (Abb. 40), könnte dies andeuten, dass diese eine ähnliche Faltung dieser Domäne bedingen. Interessant sind vor allem Homologien in der TPX2/Aurora-A Interaktionsdomäne an den Positionen $_8$ YSYDAPS $_{14, 16}$ Phe und $_{19}$ Phe, die im Komplex im engen Kontakt mit Aurora-A liegen (Bayliss et al., 2003). Suche in Prosite mit dem aus dem TPX2/INCENP-Alignment extrahierten Motiv „SQx(1,10)YxxPx(1,10)Fx(1,10)LDxE“ identifiziert neben TPX2 und INCENP noch ein weiteres humanes Protein („Serologically defined colon cancer antigen 3“ AAQ56721). Dieses ist ein uncharakterisiertes Protein mit einer Myosin II Signatur im Carboxylterminus. Strukturdaten von INCENP und Aurora-B werden zeigen, ob diese Domänen ein ähnliches Faltungsmuster haben und ob dies eine allgemeine Aurora Bindungs- und Aktivierungsdomäne darstellt. Falls dem so ist, bleibt zu analysieren, ob das durch die Datenbanksuche identifizierte putative Myosin ebenfalls ein Aktivator der humanen Aurora-A und eventuell auch Aurora-B Kinase ist.



Abb. 40 : Modellierung eines potentiellen Aurora Interaktionsmotifs.

Sequenzalignment der Aktivierungsdomänen von humanen INCENP und TPX2 (oben) im Vergleich (rote Pfeile) zu einem Alignment der entsprechenden TPX2 Domäne aus verschiedenen Vertebraten (unten).

TPX2 ist für die Lokalisation von Spindelproteinen, wie zum Beispiel des Kinesin-ähnlichen Proteins Xklp2 in *X.laevis*, verantwortlich (Wittmann et al., 1998). siRNA Experimente in der vorliegenden Arbeit zeigten, dass die Lokalisation der humanen Aurora-A Kinase an den Spindel-Mikrotubuli ebenfalls abhängig von TPX2 ist. Demgegenüber ist die subzelluläre Lokalisation von TPX2 unabhängig von Aurora-A. Diese räumliche Organisation von Aurora-A in der Zelle ist unter Umständen notwendig, um weitere Substrate von Aurora-A in räumliche Nähe zur Kinase zu bringen. In *X.laevis* ist die Lokalisation von Xklp2, neben TPX2 auch von Dynein/Dynaktin abhängig (Wittmann et al., 1998). Da auch für humanes TPX2 eine Interaktion mit dem humanen Klp2 (Hklp2) gezeigt wurde (Heidebrecht et al., 2003) und Dynein/Dynaktin wichtig für die Integrität der Centrosomen ist (Blagden und Glover, 2003), ist es interessant in weiterführenden Arbeiten zu fragen, ob auch die Lokalisation von Aurora-A abhängig von Dynein/Dynaktin ist.

Lokalisationsanalysen zeigten, dass TPX2 in humanen Zellen primär mit der Mikrotubuli assoziierten Aurora-A wechselwirkt. Demgegenüber ist die Lokalisation der centrosomalen Aurora-A unabhängig von TPX2. Es scheinen daher weitere Proteine den centrosomalen Pool von Aurora-A zu regulieren. Für mehrere Proteine wurde eine Interaktion mit Aurora-A an den Centrosomen beschrieben und kürzlich wurde für Centrosomin (CNN) in *D.melanogaster* und Ajuba in humanen Zellen gezeigt, dass sie für die Lokalisation von Aurora-A an den Centrosomen notwendig sind (Berdnik und Knoblich, 2002; Hirota et al., 2003). Centrosomin interagiert am aminoterminalen Ende mit dem γ -Tubulin-Ring Komplex (γ -TuRCs) und am Carboxylterminus mit Aurora-A (Terada et al., 2003). Ob es sich hierbei um einen konservierten Mechanismus handelt, muss abgewartet werden, da derzeit keine zu CNN homologen Proteine in anderen Spezies bekannt sind. Für Ajuba wurde ferner beschrieben, dass es Aurora-A am Centrosom aktiviert (Hirota et al., 2003). Ajuba ist ein LIM-Domänen-Protein (Goyal et al., 1999), für welches eine Funktion in der Zell-Zell Adhäsion gezeigt wurde. Es steht zudem im dynamischen Austausch zwischen dem Kern und dem Zytoplasma (Kanungo et al., 2000). Eine Rolle von Ajuba im Spindelaufbau ist daher etwas überraschend, zumal Ajuba^{-/-} Keratinozyten aus knockout Mäusen überlebensfähig sind (Marie et al., 2003).

Während in den meisten Vertebraten-Spezies TPX2 orthologe Gene identifiziert werden können, ist in *C.elegans* und *D.melanogaster* kein eindeutiges TPX2 Homolog im Genom vorhanden. Ein funktionell homologes Protein zu TPX2, welches Aurora-A an die Spindel-Mikrotubuli lokalisiert, ist jedoch in *C.elegans* isoliert worden (A. Hyman,

persönliche Kommunikation). Dass dieses Protein aus *C.elegans* keine erkennbare Homologie auf der Sequenzebene zeigte, deutet an, dass vornehmlich die Sekundär- und Tertiärstruktur von TPX2 entscheidend für dessen Funktion bezüglich Aurora-A sind. Entsprechende funktionelle Homologe zu TPX2 sollten auch in *D.melanogaster* zu finden sein. Hierfür spricht, dass in *Drosophila* zu mehreren, in Vertebraten essentiellen Proteinen, wie NuMA, kein Homolog vorhanden ist. Die Funktion von NuMA könnte hier von einem von NuMA strukturell verschiedenen Protein, dem „abnormal-spindles-protein“ (asp), übernommen werden (Blagden und Glover, 2003). Ähnliches kann für TPX2 angenommen werden.

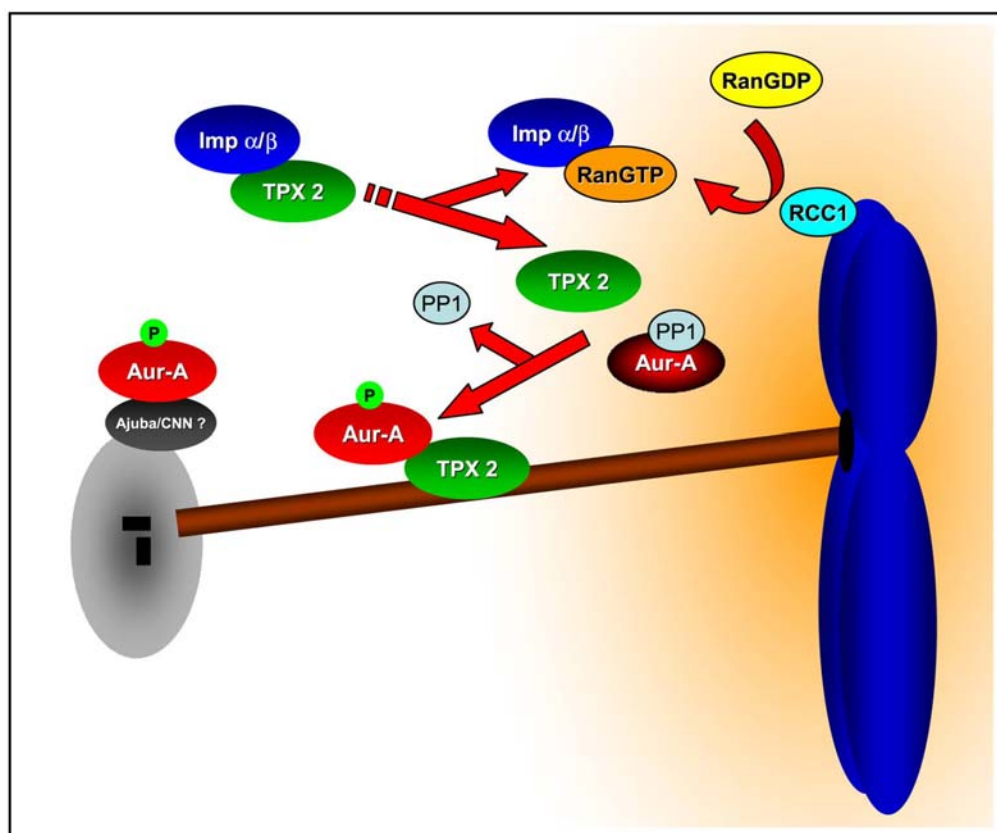


Abb. 41 : Modell der Aktion von TPX2 an der mitotischen Spindel (siehe Text).

Zusammenfassend lässt sich somit folgendes Modell der Aktion von TPX2 an der mitotischen Spindel aufstellen (siehe Abb. 41). TPX2 liegt inaktiv, gebunden an Importin α/β im Zytoplasma vor. RanGTP (eventuell als Gradient um die Chromosomen vorhanden) führt zur Aktivierung von TPX2 durch Auflösen der Importin-Interaktion. TPX2 kann nun Aurora-A binden, welches im ungebundenen Zustand durch Dephosphorylierung durch PP1 (und eventuell p53) inaktiviert wird. TPX2 kompetitiert

mit der PP1 Bindung und führt zusätzlich zu strukturellen Veränderungen in Aurora-A. Dies führt zur Aktivierung der Kinase durch Autophosphorylierung an T288. TPX2 aktiviert Aurora-A somit sowohl über einen allosterischen als auch über einen sterischen Wirkungsmechanismus. Neben der Aktivierung lokalisiert TPX2 Aurora-A zudem an die Spindel-Mikrotubuli, welche ihrerseits den Aurora-A/TPX2-Komplex weiter aktivieren. Demgegenüber ist die Lokalisation und Aktivierung von Aurora-A am Centrosom unabhängig von TPX2 und erfordert weitere Bindungspartner. Mögliche Kandidaten hierfür sind CNN und Ajuba.

TPX2 ist ein Substrat von Aurora-A

TPX2 konnte in dieser Studie des Weiteren als ein neues Substrat von Aurora-A identifiziert werden. Aurora-A phosphoryliert TPX2 *in vitro* an Serinresten in den ersten 43 Aminosäuren. Die Phosphorylierung von TPX2 durch Aurora-A ist in *X.laevis* evolutionär konserviert, wie neben unseren Daten unabhängig von zwei weiteren Arbeitsgruppen bestätigt werden konnte (Eyers et al., 2003; Tsai et al., 2003). Die Aurora-A / TPX2 Bindung, welche ebenfalls über die ersten 43 Aminosäuren des TPX2 Proteins vermittelt wird, ist unabhängig von der Aurora-A Kinaseaktivität und Aurora-A vermittelten Phosphorylierung. In *X.laevis* wird TPX2 in der Mitose phosphoryliert, was eine veränderte elektrophoretische Mobilität des Proteins bedingt (Wittmann et al., 2000). TPX2-Phosphorylierung wird hier zudem durch Stabilisierung der Mikrotubuli durch Paclitaxel verstärkt (Wittmann et al., 2000). Auch das humane TPX2 liegt in der Mitose als Phosphoprotein vor (Heidebrecht et al., 1997). TPX2 wird *in vitro* neben Aurora-A auch von den mitotischen Kinasen Cdk1-Cyclin-B, Plk1 und der MAP-Kinase phosphoryliert (Wittmann et al., 2000, I. Vernos, persönliche Kommunikation, K. Takenaka, nicht veröffentlichte Daten). Da die Phosphorylierung von *X.laevis* TPX2 durch Aurora-A zu der charakteristischen Veränderung der elektrophoretischen Mobilität des Proteins führt und Mikrotubuli-Stabilisierung die Phosphorylierung von TPX2 steigert, ist Aurora-A ein guter Kandidat für eine TPX2-Kinase *in vivo*. Um TPX2 jedoch als *in vivo* Substrat von Aurora-A zu verifizieren, ist es notwendig, die Aurora-A Phosphorylierungsstellen in TPX2 *in vitro* und *in vivo* zu kartieren. *In vitro* wurde dies in der vorliegenden Studie durch Phosphorylierung rekombinant exprimierter Fragmente des TPX2 Proteins mit rekombinanter Aurora-A zum Teil durchgeführt. Diese Versuche zeigten, dass nur der

Aminotermius von TPX2 und hier nur die ersten 43 Aminosäuren von Aurora-A phosphoryliert werden. Aurora-A Phosphorylierungsstellen im Aminotermius von humanem TPX2 konnten trotz intensiver Bemühungen durch massenspektrometrische Methoden nicht auf Aminosäurenebene identifiziert werden, was möglicherweise an den ungünstigen Größen der durch Behandlung mit verschiedenen proteolytischen Enzymen erhaltenen Peptide lag. Obwohl das Δ -N-TPX2 Fragment nicht mehr von Aurora-A phosphoryliert wurde, sind möglicherweise weitere Aurora-A Phosphorylierungsstellen im volllängen TPX2 Protein vorhanden, deren Phosphorylierung eventuell eine direkte Bindung von TPX2 an Aurora-A voraussetzen. Evidenz hierfür kommt von massenspektrometrischen Vermessungen des *in vitro* mit Aurora-A phosphorylierten TPX2 Proteins. Hierbei konnte eine Phosphorylierung des evolutionär konservierten Serinrestes 322 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Ein rekombinant exprimiertes TPX2 Fragment (AS 149-392), welches dieses Serin beinhaltet, konnte *in vitro* jedoch nicht durch Aurora-A phosphoryliert werden.

In TPX2 aus *X.laevis* wurden drei Serinreste (S48, S90 und S94) als Aurora-A Phosphorylierungsstellen identifiziert (Eyers und Maller, 2003). Überraschenderweise sind nur die Aminosäuren S90 und S94 in humanen TPX2 konserviert. Dies legt nahe, dass im humanen TPX2 eventuell andere Aminosäuren von Aurora-A phosphoryliert werden als in *X.laevis* TPX2. Im Einklang hiermit konnte gezeigt werden, dass die nur für das *X.laevis* TPX2 Protein beobachtete Änderung der elektrophoretischen Mobilität nach Aurora-A Phosphorylierung auf Phosphorylierung des im humanen TPX2 nicht konservierten Serinrestes an Position 48 zurückzuführen ist (Eyers und Maller, 2003).

Was ist nun die biologische Funktion der Phosphorylierung von TPX2 durch Aurora-A? Mögliche Funktionen von TPX2, die durch Aurora-A vermittelte Phosphorylierung reguliert werden könnten, sind die Bindung an Mikrotubuli, die Interaktion mit anderen Wechselwirkungspartnern und die Mikrotubuli-Nukleationsaktivität. In *X.laevis* ist gezeigt, dass die Mikrotubuli-Bindungsaffinität von TPX2 jedoch nicht vom Phosphorylierungsstatus des Proteins abhängig ist (Wittmann et al., 2000). Somit bleibt zu klären, ob Aurora-A vermittelte Phosphorylierung die Interaktion mit anderen Proteinen beeinflusst. Derzeit sind mit der Ausnahme von Hklp2 und Aurora-A die zellulären Interaktionspartner des humanen TPX2 Proteins jedoch noch nicht bekannt. Ob Phosphorylierung die Mikrotubuli-Nukleation von TPX2 beeinflusst, ist eine interessante Fragestellung für weiterführende Studien. Ein geeignetes System hierfür

bieten *X.laevis* Oozyten-Extrakte, in denen Aurora-A und TPX2 durch Immundepletion entfernt und durch rekombinant exprimierte Mutanten ersetzt werden können.

TPX2 RNAi Phänotyp Analyse

TPX2 ist in *X.laevis* ein essentielles, mitotisches Spindelprotein, dessen Depletion in Oozyten-Extrakten zu unfokussierten Spindelpolen führt, wohingegen ein Überschuss an TPX2 monopolare Spindeln induziert (Wittmann et al., 2000). Humanes TPX2 ist auch in *X.laevis* funktionell, was für eine starke evolutionäre Konservierung dieses Proteins spricht, die auch auf Ebene der Primärsequenzen zu beobachten ist (Gruss et al., 2002). In dieser Arbeit wurde erstmals der Phänotyp der TPX2 Depletion durch siRNA in humanen HeLa Zellen untersucht. Depletion von TPX2 führte zu einem Arrest der Zellen in der Prometaphase. Diese Zellen konnten nach 36 Stunden Behandlung mit dem TPX2 spezifischen siRNA Duplex keine bipolaren Spindeln mehr bilden und zeigten zwei Aster deren Mikrotubuli nicht miteinander interagierten. Konsistent mit den Beobachtungen in *X.laevis*, wo TPX2 die Spindelpolstruktur beeinflusst, ist in humanen Zellen eine Fragmentierung der Spindelpole, nach längerer Behandlung der Zellen mit dem TPX2 Duplex, zu erkennen. Dies ist zu beobachten für die Polmarker Aurora-A, NuMA und γ -Tubulin. Ultrastrukturanalysen müssen klären, ob es sich hierbei um eine Fragmentierung der Centrosomen selbst oder um eine Auflösung der PCM handelt. Unabhängig von dieser Arbeit wurde die Fragmentierung der Spindelpole nach TPX2 Depletion durch siRNA in HeLa Zellen bestätigt (Garrett et al., 2002). Es konnte ferner gezeigt werden, dass die Fragmentierung des centrosomalen Materials zu funktionellen Spindelpolen führen kann und dieser Vorgang abhängig von intakten Mikrotubuli und dem Spindelmotor Eg5 ist (Garrett et al., 2002).

Überexprimiertes TPX2 lokalisiert in humanen Fibroblasten in der Interphase im Kern wohingegen es in der Mitose die Mikrotubuli sowie die kondensierten Chromosomen dekoriert. Abhängig vom Überexpressions-Spiegel ist TPX2 auch an den Interphase-Mikrotubuli nachzuweisen und führt bei hoher Expression zu Mikrotubuli-Bündelung, was typisch für Mikrotubuli-assoziierte-Proteine (MAPs) ist (Cassimeris und Spittle, 2001). Dies führt bei hoher Überexpression von TPX2 so zu mitotischem Arrest der Zelle in einem Prometaphase ähnlichen Stadium mit monopolarer Spindeln (Gruss et al., 2002).

Depletion von TPX2 durch siRNA (diese Studie) und Antikörperinjektion (Gruss et al., 2002) führt ebenfalls zu einem Block der Zellen in einem Prometaphase ähnlichen

Stadium mit zwei Spindelpolen, die unabhängige Mikrotubuli-Aster formieren. Diese Zellen sterben schließlich ab, was den beobachteten Rückgang des mitotischen Index erklärt.

Es konnte somit gezeigt werden, dass TPX2 auch in humanen Zellen essentiell für den Aufbau einer bipolaren mitotischen Spindel ist. Interessanterweise ist die Anzahl der Mikrotubuli an den Chromosomen in humanen Zellen, die kein TPX2 besitzen, deutlich geringer (Gruss et al., 2002). Dies ist ein Indiz dafür, dass TPX2 auch in humanen Zellen Mikrotubuli an den Chromatiden nukleiert. Experimente in *X.laevis* Oozyten-Extrakten belegen, dass TPX2 die Ran-abhängige Mikrotubuli-Nukleation kontrolliert (Gruss et al., 2001). Da die Depletion von Komponenten des Ran Netzwerkes, wie Importin, RanGAP oder RanBP2, in *C.elegans* zu vergleichbaren Spindeldefekten führt (Askjaer et al., 2002), spricht dafür, dass die TPX2 vermittelte Ran-abhängige Nukleation von Mikrotubuli an den Chromosomen evolutionär konserviert ist.

Für eine Erklärung der beobachteten Phänotypen der siRNA in humanen HeLa Zellen ist jedoch die Funktion von TPX2 an den Centrosomen alleine ausreichend. Weiterführende Studien werden daher beweisen müssen, ob ein Ran-abhängiger Mikrotubuli-Nukleationsmechanismus auch in humanen Zellen existiert.

Aurora-A, TPX2 und maligne Entartung

Überexpression aktiver Aurora-A Kinase kann Zellen transformieren. Aurora-A ist somit, wie in der Einleitung im Detail diskutiert, ein Proto-Onkogen (Bischoff et al., 1998). Es wurde gezeigt, dass Überexpression der Kinase zu Aneuploidie führt, was durch Fehler in der Zytokinese bedingt ist (Meraldi et al., 2002). Wie Aurora-A die Zytokinese beeinflussen kann, ist derzeit nicht bekannt. Da gerichtete Bewegung des Mutter-Centriols in den Mittelkörper für den Abschluss der Zytokinese wichtig ist (Piel et al., 2001), ist ein interessantes Modell daher die Annahme einer Störung dieser Centrosomen-Bewegung durch deregulierte Aurora-A Expression. Dies könnte zum Beispiel durch eine gestörte Centrosomen-Maturation, ausgelöst durch Deregulation der Aurora-A Kinase, induziert werden.

Das Aurora-A Gen liegt in einer in humanen Tumoren häufig amplifizierten Region auf Chromosom 20 (20q13.2). Interessanterweise wurde auch das humane TPX2 Gen als ein in Lungenzell-Karzinomen differentiell exprimiertes Gen identifiziert (Manda et al.,

1999). TPX2 lokalisiert ebenfalls auf Chromosom 20 (20q11.2), in relativer Nähe zu Aurora-A (Zhang et al., 1999). Amplifikation einer erweiterten Region des 20q13.2-Amplikons beziehungsweise Deregulation der TPX2-Expression über andere Mechanismen könnte so zu erhöhter TPX2 Expression und in der Folge zur Aktivierung von Aurora-A in der Zelle führen. TPX2 könnte so den kanzerogenen Phänotyp der Aurora-A Überexpression weiter steigern, beziehungsweise Zellen mit moderater Aurora-A Überexpression transformieren. Es ist daher äußerst interessant zu fragen, ob ein solcher Zusammenhang in humanen Zellen besteht und ob Überexpression von TPX2 den Phänotyp der Aurora-A Überexpression in Modellsystemen verstärkt.

Ausblick

Mit TPX2 konnte in dieser Arbeit ein wichtiger, neuer Regulator der humanen Aurora-A Kinase identifiziert werden. Die Eingrenzung der Interaktions- und Aktivierungsdomäne auf ein kleines Peptid von TPX2 sowie die Aufklärung der Struktur von Aurora-A mit TPX2 (Bayliss et al., 2003) erlauben ein besseres Verständnis dieser Interaktion. Hierdurch sollte es möglich sein, chemische Inhibitoren der TPX2 / Aurora-A Interaktion zu generieren. Solche Stoffe sind nicht nur als Hilfsmittel für die weitere Charakterisierung von TPX2 und Aurora-A geeignet, sondern könnten auch neue Ansatzpunkte für die Behandlung maligner Erkrankungen, die mit übermäßiger Aurora-A Kinaseaktivität einhergehen, dienen.

Die exakte Identifikation der Phosphorylierungsstellen in humanen TPX2 und deren Funktion wird weitere Einblicke in den Spindelaufbauprozess erlauben. Ebenso muss in weiterführenden Untersuchungen der exakte Mechanismus der Mikrotubuli-Wirkung geklärt werden.

Neben TPX2 konnte mit KIAA1741 (TAB182) ein weiteres Substrat von Aurora-A identifiziert werden. Die Lokalisation von KIAA1741 an Aktin-Strukturen impliziert, dass Aurora-A eventuell weitere wichtige Funktionen im Zytoplasma erfüllt. Es bleibt zu analysieren, wie Aurora-A und KIAA1741 miteinander wechselwirken und was die exakte Funktion von KIAA1741 und dessen Phosphorylierung durch Aurora-A in humanen Zellen ist.

Material und Methoden

Material und Bezugsquellen

Escherichia coli Stämme

Für Klonierungen wurden chemisch kompetente Bakterien des Stammes XL-1 blue (K12 Derivat) (Stratagene) verwendet. Für Proteinexpressionen wurden die Stämme BL-21, BL-21RP (Stratagene) sowie JM-109 RIL (BD Bioscience (Clontech)) verwendet.

Kultur der Bakterien erfolgte in LB Medium wie in (Sambrook J et al., 2001) beschrieben. Um Bakterien langfristig zu lagern wurden stationäre Kulturen mit 18 % Glycerol (Endkonzentration) versetzt und bei -80 °C gelagert.

Zelllinien und Hefestämme

Zelllinie	Organismus / Gewebe	Referenz
U2OS	Human / Osteosarkom	ATCC (HTB-96)
HeLa ATCC	Human / Zervikalkarzinom	ATCC (CCL-2)
HeLa S3	„	ATCC (CCL-2.2)
293 T	Human / Nierenkarzinom	ATCC (CRL-11268)
Sf9	<i>Spodoptera frugiperda</i>	ATCC (L-1711)
PJ69-4A	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	P. James, Univ. of Wisconsin

Tab. 5 : In dieser Arbeit verwendete Zelllinien.

Medien / Kultur :

Alle humanen Zellen wurden bei 37 °C in einer 5 % CO₂ Atmosphäre in DME Medium (GIBCO) beziehungsweise RPMI 1410 Medium (GIBCO), supplementiert mit 10 % Hitze-inaktiviertem fötalem Kälberserum und 50 µg/ml Streptomycin und Penicillin kultiviert.

Sf9 Zellen wurden bei 27 °C in TC-100 1x Medium (GIBCO) supplementiert mit 10 % Hitze-inaktiviertem fötalem Kälberserum und 50 µg/ml Streptomycin und Penicillin kultiviert.

Hefen wurde bei 30 °C in YPD-Medium (1 % Bacto Yeast Extract (Difco), 2 % Bacto-Peptone (Difco), 2 % D-(+)-Glukose) als Flüssigkultur beziehungsweise auf Agarplatten (2 % Agar) kultiviert. Zur Selektion wurde SC Medium (0,67 % Nitrogen Base, 2 % Glukose) mit den entsprechenden Aminosäuren verwendet.

Enzyme, Proteine und Nukleinsäuren, Aminosäuren

DNA Restriktionsenzyme wurden von NEB-Biolabs bezogen.

Markerproteine für Gelfiltration und SDS-PAGE wurden von Sigma bezogen.

Geschnittene Lambda DNA, als Marker für Agarose-Gelelektrophorese, wurde von NEB bezogen. Lachs-Sperma DNA für Hefetransformationen wurde von Sigma bezogen.

Isotop-markiertes ATP wurde von Amersham, isotopmarkiertes Methionin von Promega bezogen.

Oligonukleotide

Name	Nukleotidsequenz (5' → 3')
M0464	GGGGATCCATGTCACAAGTTAAAAGCTCTTATTCC
M0465	GGGGTACCTTAGCAGTGGAAATCGAGTGGAG
M0935	GGCAAGGCTGCCTCCCTGGTAG
M0936	CAAGGGCTCCTGCGACTCGTATC
M1208	GGCCGGTACCATTCTCCAAATTGGCCTTCTCC
TPX-Clal	CGGGATCCATCGATGAAATTCTACCTC

Tab. 6 : In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide.

Alle Oligonukleotide wurden von Thermo synthetisiert. Die Anlagerungstemperatur der Nukleotide wurde abgeschätzt (je A/T 2 °C je G/C 4°C).

Puffer und Lösungen

1x PBS pH 7,4

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

8 mM Na₂ HPO₄

1,4 mM KH₂PO₄

Annealing Puffer

1 M NaCl

200 mM Tris pH 8,0

10 mM EDTA

BRB80

80 mM PIPES pH 6,8

1 mM MgCl₂

1 mM EGTA

LB-Medium (Agar)

1 % Trypton (Difco)

0,5 % Hefeextrakt (Difco)

1 % NaCl

(1,5 % Agar)

sterilisiert durch Autoklavieren

Sammelgelpuffer/Trenngelpuffer

0,5 M Tris, pH 6,8/1,5 M Tris, pH 8,8

0,1 % SDS

Running Puffer

60 mM Tris

0,55 % Glycin

0,1 % SDS

Protein-Probenpuffer

2 % SDS

100 mM DTT

60 mM Tris/HCl, pH 6,8

1 % Bromphenolblau

20 % Glycerol

Protein-Transferpuffer

250 mM Tris

1,92 M Glycin

0,1 % SDS

20% Methan

Sonstige Materialien

Elektroporationsküvetten 0,2 cm (BioRad), Filterpapier 3MM (Whatman), Glasperlen 150-212 μm (Sigma), Petrischalen und 15 ml und 50 ml PPN-Röhrchen (Greiner, Sarsedt), Sterilfilter 0,20 μm (Sartorius), Thermalpapier (Hitachi), Deckgläser (Marienfeld, 18x18 mm, Nr.1), Objektträger (Marienfeld, 75x25 mm, geputzt), Zellkulturgefäße (Nunc).

Handhabung und Modifikation von Nukleinsäuren

Plasmid-Präparationen wurden mit Reagenzsätzen der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers durchgeführt. DNA-Konzentrationsbestimmungen wurden photometrisch an einem Ultrospec® 3100 pro der Firma Amersham-Pharmacia durchgeführt.

Für DNA Ligationen wurde der „Quick-Ligation“ Reaktionssatz von Roche, nach Angaben des Herstellers, verwendet.

Soweit nicht anders angegeben, wurden Polymerase-Ketten-Reaktionen (PCR) mit dem „HiFi“ DNA-Polymerasenmix (Roche) durchgeführt. PCR Ansätze wurden in einem PCR Amp 9600 Thermocycler der Firma Perkin Elmer inkubiert. Alle PCR-Produkte wurden sequenziert.

Nukleotid-spezifische Mutationen wurden nach dem Protokoll des „Quick site mutagenesis kit“ der Firma Stratagene nach Angaben des Herstellers mit Enzymen von NEB Biolabs durchgeführt.

DNA Sequenzierungen wurden bei Medigenomix (Martinsried) in Auftrag gegeben.

DNA wurde aus Agarosegelen mit dem „Gelextraction“ Reagenzsatz der Firma Qiagen isoliert.

Alle sonstigen Handhabungen und Modifikationen von DNA wurden nach Standardmethoden wie beschrieben durchgeführt (Sambrook J et al., 2001).

Klonierungen

KIAA1007

Die partielle KIAA1007 cDNA (3,5 kb) wurde durch Restriktion mittels *EcoRI* und *BamHI* aus dem EST Klon DKFZp434N241 als EGFP Fusionskonstrukt in pEGFP-C2 kloniert und sequenziert (TK 35). Dieses Konstrukt wurde durch Restriktion mit *EcoRI* und *NotI* in pcDNA3.1 3myc-C subkloniert (TK 36).

KIAA1741

Die entsprechende 4 kb cDNA von KIAA1741, welche ein 109 kDa Protein kodiert, wurde aus dem Klon KIAA1741 (Kazusa Human cDNA Project) mit *Sall* und *SpeI* in pEGFP-C2 kloniert. Vollängen KIAA1741 (TAB182) im Vektor pLPC wurde von Susan Smith zur Verfügung gestellt (TK 49) (Seimiya und Smith, 2002).

Das 5' Ende der KIAA1741 DNA wurde durch nested-PCR aus einer Matchmaker cDNA Bibliothek aus humaner Leber (Clontech) mit den KIAA1741 spezifischen Primern M0935 und M0936, sowie zwei Linker-spezifischen Primern (Clontech) gewonnen. Das PCR-Produkt wurde über Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt und in pCRTopoII kloniert (TK 48).

KIAA1741-Antigen

Ein für ein 44 kd Fragment (AS 563-975) von KIAA1741 kodierendes Expressions-Plasmid wurde durch Restriktion von TK43 mit *Sall* und *HindIII* und Subklonierung in pQE30 hergestellt (TK 47).

TPX2

Vollängen cDNA des humanen TPX2 Proteins wurde über die Ligation der cDNA Klone IMAGE 998HO 51429Q2 und DKFZ p434 F192Q2 über eine interne *NdeI* Restriktionsstelle erhalten. Zum Subklonieren wurde die cDNA über die Primer M464 und M465 amplifiziert und in pcDNA3.1(-) myc3 (TK 31) und pGEX-6P-3 subkloniert (TK 37). Alternativ wurde ein pQE60 (Qiagen) Konstrukt von O.Gruss verwendet. Hier ist eine aminoterminal Protein-A Bindungsdomäne (zz-Domäne) an die TPX2 cDNA fusioniert, gefolgt von dem Histidin Tag des pQE60 Vektors (TK 46) (Gruss et al., 2001).

TPX2-Fragmente

Ausgehend von dem Plasmid TK31 wurden folgende Konstrukte, kodierend für die angegebenen Nukleotide von TPX2, in pQE30 (Qiagen) kloniert:

TK 17: Nukleotide 1-1177 , kloniert über *SacI* und *BamHI*

TK 18: Nukleotide 1177-1672, kloniert über *SacI* und *PstI*

TK 19: Nukleotide 1-451 , kloniert über *ClaI* und *BamHI*

TK 20: Nukleotide 1672-2244, kloniert über *PstI* und *HindIII*

TK 21: Nukleotide 451-2244, kloniert über PCR mit den Primern M0465 und TPX-ClaI

In pGEX-6P-3 wurde kloniert:

TK 56: Nukleotide 1-129, kloniert über PCR mit den Primern M1208 und M0464

Verwendete Plasmide

Name	tag	Gen	Insert	Art	Vektor
TK 1	GST	Aurora-A	K162R	human	pVL13GST93
TK 2	GST	Aurora-A	volllänge	human	pVL13GST93
TK 14	-	TPX2	hTPX2 cDNA inkomplett	human	pBluescriptSK
TK 15	-	TPX2	hTPX2 cDNA inkomplett	human	pSPORT1
TK 17	his6	TPX2	N-term Fragment (ATG- <i>SacI</i>)	human	pQE-30
TK 18	his6	TPX2	<i>SacI</i> - <i>PstI</i> Fragment	human	pQE-30
TK 19	his6	TPX2	ATG- <i>ClaI</i> Fragment	human	pQE-30
TK 20	his6	TPX2	<i>PstI</i> - <i>HindIII</i> Fragment	human	pQE-30
TK 21	his6	TPX2	<i>ClaI</i> - <i>SacI</i> Fragment	human	pQE-30
TK 24	his6	Aurora-A	WT, ersten 109 AA (N-term Au2)	human	pQE-30
TK 25	his6	Aurora-A	WT, letzten 300 AA (C-term Au2)	human	pQE-30
TK 26	myc3	TPX2	WT, N-term	human	pcDNA3.1(-)myc3
TK 27	myc3	TPX2	WT, far N-term	human	pcDNA3.1(-)myc3
TK 29	GAL4 AD	Aurora-A	WT	human	pGAD-C(1)
TK 30	GAL4 BD	Aurora-A	WT	human	pGBDU-C(1)
TK 31	myc3	TPX2	WT	human	pcDNA3.1(-)myc3
TK 32	GAL4 AD	TPX2	WT	human	pGAD-C(1)
TK 33	GAL4 BD	TPX2	WT	human	pGBDU-C(1)
TK 34	EGFP	KIAA1741	partielle Sequenz, EST cDNA Klon	human	pEGFP-C-2
TK 35	EGFP	KIAA1007	partielle Sequenz, EST cDNA Klon	human	pEGFP-C-2
TK 36	myc3	KIAA1007	partielle Sequenz, EST cDNA Klon	human	pcDNA3.1myc3-C
TK 38	GAL4 AD	Aurora-A	KD (K162R)	human	pGAD-C(1)
TK 39	GAL4 BD	Aurora-A	KD (K162R)	human	pGBDU-C(1)
TK 40	Gal4-AD	Aurora-A	Aurora A - Aminoterminus	human	pGAD-C(1)
TK 41	Gal4-AD	Aurora-A	Aurora A - Carboxylterminus	human	pGAD-C(1)
TK 43	-	KIAA1741	KIAA EST-Klon	human	pBSIISK+
TK 44	-	KIAA1007	KIAA EST-Klon	human	pSPORT1
TK 46	zz	TPX2	TPX2, WT	human	pQE70zz
TK 47	his6	KIAA1741	KIAA1741 - 44kDA Fragment	human	pQE30
TK 48	-	KIAA1741	5' cDNA von KIAA1741	human	pCR4-TOPO
TK 49	myc	TAB182	WT	human	pLPC
TK 52	myc3 N	TPX2	Carboxylterminus von TPX2	human	pcDNA3.1(-)myc3
TK 53	Gal4-BD	Aurora-A	K162R	human	pGBDOmega-C1
TK 54	myc3 N	TPX2	Δ N TPX2 (43-747)	human	pcDNA3.1(-)myc3
TK 55	myc3 N	TPX2	AS 1-43	human	pcDNA3.1(-)myc3
TK 56	GST	TPX2	AS 1-43	human	pGEX-6P-3
TK 57	his6	TPX2	Δ N TPX2 (43-747)	human	pQE-30
TK 66	myc3	Aurora-A	WT	human	pcDNA3.1(-)myc3
TK 71	his6	Aurora-A	WT	human	pET28b+
TK 72	his6	Aurora-A	K162R	human	pET28b+

Tab. 7 : Verwendete Plasmide.

Zellbiologische und biochemische Methoden

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Immunblotting von Proteinen

Die elektrophoretische Auftrennung von denaturierten Proteinen erfolgte durch vertikale, diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Die Protein-Proben wurden in Protein-Auftragspuffer mit DTT beziehungsweise β -Mercaptoethanol für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert und anschließend auf 0,75 mm starken Polyacrylamid-Gelen nach Lämmli (Laemmli, 1970) mit Trenngelen von 7,5 %, 10 % oder 15 % Acrylamid und 0,8 % Bis-Acrylamid (ProtoGel, National Diagnostics) in SDS Puffer im elektrischen Feld aufgetrennt (SDS-PAGE). Proteine wurden durch Inkubation der Gele für 30 Minuten in einer warmen Coomassie Brilliant Blue (BB) Lösung (2,5 % R-250 in 10 % Essigsäure und 45 % Ethanol) gefärbt und anschließend in Destain-Lösung (7 % Essigsäure 25 % Ethanol in Wasser) entfärbt.

Zum Nachweis von Proteinen über Western-Blot-Analyse (Towbin et al., 1979), wurden die aufgetrennten Proben durch Semidry-Blotting mittels einer Hoefer Semiphor™ Apparatur (Amersham-Pharmacia) auf Protran® Nitrocellulose-Membranen (Schleicher & Schuell) bei 0,8 mA/cm² übertragen. Die Membranen wurden für eine Stunde mit 5 % Magermilchpulver in PBS abgesättigt und anschließend bei Raumtemperatur für eine Stunde mit den angegebenen primären Antikörpern inkubiert (für Antikörper siehe Tab. 8). Nachweis des primären Antikörpers erfolgte nach Waschen der Membran für 30 Minuten in PBST (PBS mit 0.05 % Tween20) mit Meerrettich Peroxidase (HRP) konjugierten Ziege α -Maus (Amersham, 1:3000) beziehungsweise HRP-konjugierten Esel α -Kaninchen Antikörpern (Amersham, 1:3000) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Gebundene HRP Konjugate wurden mittels des ECL „SuperSignal® detection system“ (Pierce) nachgewiesen. Die Resultate wurden durch ein elektronisches Dokumentationssystem (FujiFilm, Intelligent Dark Box II) beziehungsweise durch Belichten von Filmen (Kodak) dokumentiert.

Reinigung rekombinanter Proteine aus Sf9 Zellen

Aurora-A WT und K162R cDNAs (Meraldi et al., 2002) wurden als GST-Fusionen in pVL13GST93 (Amersham-Pharmacia) kloniert (TK1, TK2). Rekombinante Baculoviren wurden mittels des Baculo Gold Kits (Pharmingen Corp.) erzeugt. Sf9 Zellen wurden in

Lysepuffer (LP) (10 mM HEPES pH 7,7, 150 mM NaCl, 5 mM EGTA, 1 % NP40) lysiert, welcher mit Protease- (1 mM PMSF, 10 µg/ml Pepstatin A, 10 µg/ml Aprotinin, 10 µg/ml Leupeptin) und Phosphataseinhibitoren (20 mM β -Glycerophosphat, 5 mM NaF, 100 µM Na_3VO_4) versetzt wurde. Das Zelllysate wurde anschließend bei 16.100 g für 15 Minuten bei 4 °C geklärt. Aurora-A Protein wurde an Glutathione Sepharose™ 4B (Amersham-Pharmacia) gebunden und in LP mit 300 mM NaCl, und in Kinase-Puffer (KP) (20 mM HEPES pH 7,4, 150 mM KCl, 5 mM MnCl_2 , 5 mM NaF, 1 mM DTT) gewaschen.

Je nach Verwendung wurden die Proteine mit 10 mM reduzierten Glutathion in Kinase-Puffer eluiert beziehungsweise durch Behandlung mit Prescission-Protease in Kinase Puffer für 6 Stunden bei 4 °C von der Matrix abgelöst. Überschüssige Prescission-Protease wurde durch erneute Inkubation mit Glutathion-Beads entfernt.

Reinigung rekombinante Proteine aus *E. coli*

Soweit nicht anders angegeben erfolgte die Aufreinigung rekombinanter his-Fusionsproteine nach folgendem Standard-Protokoll:

Bakterien einer $\text{OD}_{600} = 0,6$ wurden für 4 Stunden mit 1 mM IPTG bei 30 °C induziert. Die Bakterien wurden in Bakterien-Lysepuffer (PBS mit 1 % NP40, 1mg/ml Lysozym, 30 µg/ml RNase, 30 µg/ml DNase, 10 mM Imidazol und Proteaseinhibitoren (Complete Tabletten, Roche) lysiert. Lysate wurden bei 16.100 g für 20 Minuten bei 4°C abzentrifugiert und Bindung an Nickel Sepharose erfolgte für 1 Stunden bei 4 °C unter ständiger Rotation. Die Matrix wurde mit Wasch-Puffer (1x PBS mit 500 mM NaCl, 1 % NP40, 30 mM Imidazol) auf einer Säule (Bio-Rad) gewaschen und mit 250 mM Imidazol in PBS oder Kinase Puffer eluiert. Anschließend wurden die Proteine über eine Desalting-Sepharose-Säule (BioRad) gegeben, beziehungsweise wurden über Nacht bei 4°C gegen den entsprechenden Puffer dialysiert. Proteine wurden hierbei je nach Verwendung in PBS oder Kinase Puffer aufgenommen.

TPX2

TPX2 Protein wurde in mit 1 mM IPTG induzierten *E.coli* BL-21 pRep4 (Stratagene) bei 30 °C für 4 Stunden exprimiert und mit Nickel-Sepharose (Qiagen) aufgereinigt und in PBS aufgenommen.

TPX2 Fragmente

Die Aufreinigung der TPX2-Fragmente erfolgte nach Expression in *E.coli* BL21-RP mit Nickel Sepharose (Qiagen).

Die Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen erfolgte nach Expression in *E.coli* (BL21) mit Glutathione Sepharose. Es wurden dieselben Bedingungen wie bei der Aufreinigung von His-Proteinen verwendet, den Puffern wurde kein jedoch Imidazol zugesetzt und die Elution erfolgte mit 10 mM reduzierten Glutathion in 1x PBS. Für Kinaseassays wurden die Proteine in Kinase Puffer mit 10 mM reduzierten Glutathion eluiert.

KIAA1741 44kDa-Fragment

Das his-Fusionsprotein, kodiert von TK47, wurde nach Standard-Bedingungen aufgereinigt. Zur Erzeugung von Antikörpern wurde dieses Protein zusätzlich durch SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteinbande ausgeschnitten und das Protein durch Elektroelution in 0,5 x SDS-PAGE Running-Puffer gewonnen.

Generierung spezifischer Antikörper

Aurora-A

Ein polyklonaler Antikörper aus Kaninchen wurde gegen das humane Aurora-A Protein generiert. Hierzu wurde das carboxyterminale Peptid "CQNKESASKQS" der humanen Aurora-A, gebunden an keyhole-limpet-hemocyanin, als Antigen verwendet (durchgeführt von Patrick Meraldi).

Das so gewonnene reaktive Serum wurde über das an Thiopropyl Sepharose™ (Amersham-Pharmacia) gekoppelte antigene Peptid aufgereinigt. Hierzu wurde 1 mg des antigenen Peptids an 500 µl (75 %) Thiopropyl Sepharose™ in Bindungs-Puffer (100 mM Tris pH 7,5; 500 mM NaCl; 1 mM EDTA; 5 mM β-Mercaptoethanol) über Nacht bei 4 °C gekoppelt. Die Bindung wurde photometrisch verfolgt. Anschließend wurde die Sepharose in Bindungs-Puffer gewaschen und durch Inkubation über Nacht bei 4°C in 100 mM Ethanolamin pH 7,5 und anschließend mit 100 mM Triethylamin pH 11,5 inaktiviert. Die Matrix wurden in PBS und Tris pH 7,5 gewaschen. 10 ml Serum verdünnt 1:2 in 10 mM Tris pH 7,5 wurden für zwei Stunden mit der Matrix inkubiert. Anschließend wurde mit je 6 ml 10 mM Tris pH 7,5 und 10 mM Tris pH 7,5 mit 0,5 M NaCl gewaschen. Die Elution erfolgte mit 3 ml Glycin pH 2,5 (fraktioniert zu je 500 µl). Die Elutionen wurden sofort mit Tris Puffer auf pH 8 eingestellt und die Antikörper-haltigen Fraktionen vereint. Nach waschen mit 40 ml PBS auf einer Centricon Säule (Millipore) (Zentrifugation bei 3000 g), wurde der Antikörper in PBS mit 0,1 % Natriumazid gelagert.

TPX2

mAk Ki-S2 und ein affinitätsgereinigter polyklonaler Antikörper waren Geschenke von H.J. Heidebrecht (Uni Kiel) und O.Gruss (EMBL).

KIAA1741

Ein polyklonaler Antikörper aus Kaninchen wurde gegen des rekombinant exprimierte 44kDa Fragment von KIAA1741 (siehe oben) generiert (BioGenes GmbH, Berlin). Das Serum wurde über das Antigen, welches kovalent an AffiGel 10 (Biometra) gebunden war, aufgereinigt. Hierzu wurde das Peptid für 5 Stunden an die Matrix gekoppelt und diese anschließend mit 0,1 M Ethanolamin inaktiviert. 3 ml Serum wurden mit 3 ml 10 mM Tris pH 7,5 verdünnt und für 2 Stunden bei 4°C mit der so gewonnenen Matrix inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit je 6 ml 10 mM Tris pH 7,5 und 10 mM Tris pH 7,5 mit 500 mM NaCl gewaschen. Die Antikörper wurden in 100 mM Glycin pH 2.5 eluiert und sofort durch Zugabe von Tris Puffer auf pH 8 gepuffert. Nach Dialyse gegen PBS wurde der Antikörper in PBS mit 0,1 % Natriumazid bei 4 °C geleagert.

Zellextrakte

Zellextrakte wurden aus mitotischen HeLa S3 Zellen gewonnen. Die Zellen wurden in 1 l Suspensionskulturen in RPMI 1410 Medium (GIBCO), supplementiert mit 10 % Hitze-inaktivierten fötalem Kälberserum und 50 µg/ml Streptomycin und Penicillin kultiviert. Durch Zugabe von 100 ng/ml Nocodazol für 20 Stunden wurden die Zellen in der Prometaphase arretiert. Alternativ wurden die Zellen durch Zugabe von 1,6 µg/ml Aphidicolin in der G₁-Phase arretiert. Die Qualität des Zellzyklus-Arrests wurde durch mikroskopische Analyse mittels DAPI Färbung kontrolliert. Typischerweise zeigten etwa 80 % der Zellen kondensierte DNA nach Nocodazol Behandlung. Anschließend wurden die Zellen geerntet, in PBS mit 1 mM PMSF gewaschen und in NP40 Puffer (50 mM Tris pH8,0, 150 mM NaCl, 1 % NP40) mit 10 µg/ml RNase, 10 µg/ml DNase, Proteaseinhibitoren (1 mM PMSF, 10 µg/ml Pepstatin A, 10 µg/ml Aprotinin, 10 µg/ml Leupeptin) und Phosphataseinhibitoren (10mM β-Glycerolphosphat, 5 mM NaF, 100 µM Na₃VO₄) aufgenommen. Nach 30 Minuten auf Eis wurde das Lysat bei 16.100 g für 15 Minuten bei 4 °C abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Protein-Mengenbestimmungen wurden mit dem Dc-Proteinassay (Bio-Rad) nach Angaben des Herstellers durchgeführt und Aliquote von 500 µl der Extrakte in flüssigem Stickstoff

schock-gefroren und bei -80 °C gelagert. Extrakte hatten typischerweise eine Konzentration von 18 µg/µl Gesamtprotein.

Immunpräzipitationen

Für Immunpräzipitationen wurden 500 µl der HeLa Extrakte (~ 18 µg/µl Proteingehalt) verwendet. Die Lysate wurden für 30 Minuten unter Rotation bei 4 °C mit der entsprechenden Matrix vorgeklärt. Um Aurora-A Komplexe zu präzipitieren wurde der affinitätsgereinigte polyklonale α -Aurora-A Antikörper verwendet. Der Antikörper (5-10 µg) wurde für eine Stunden mit den Zellextrakten (etwa 20 mg Protein) inkubiert, Affi-Prep® Protein-A Support (5-10 µl Bettvolumen) wurde zugegeben und es wurde für weitere 3 Stunden bei 4 °C unter ständiger Rotation inkubiert. Die Matrix wurde abzentrifugiert, in LS Puffer (50 mM Tris pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,1 % NP40) gewaschen und in Lämmli-Puffer für 5 Minuten bei 95 °C gekocht. Als Kontrolle wurde der Antikörper für 30 Minuten mit einem 100-fachen molaren Überschuss an antigenem Peptid vor der Immunpräzipitation blockiert.

Um TPX2 Komplexe zu isolieren wurde der monoklonale Antikörper Ki-S2 (freundlicherweise von H.J. Heidebrecht zur Verfügung gestellt) an Protein G Sepharose™ 4 fast flow (Amersham-Pharmacia) gebunden. Hierzu wurden 2 ml Kulturüberstand über Nacht bei 4 °C mit 20 µl Sepharose inkubiert. Diese Sepharose-Antikörper Matrix wurden 3 Stunden in Zellextrakten inkubiert, anschließend in LS-Puffer gewaschen und in Lämmli-Puffer gekocht.

Gelfiltration von Zellextrakten

Für die Gelfiltrationschromatographie von Zellextrakten wurde eine Äkta-Prime® LC-Anlage (Amersham-Pharmacia) benutzt. 500 µl Zellextrakt (etwa 18 µg/µl), hergestellt wie oben beschrieben, wurden über 0,2 µm Filter (Millex GV, Millipore) filtriert und auf eine mit NP40 Puffer äquilibrierten Superose® 12 HC 10/30 Säule (Amersham-Pharmacia) aufgetragen. Die Trennung erfolgte bei einem Durchfluss von 0,2 ml/min. 500 µl Fraktionen wurden automatisch gesammelt. Die Elution wurde durch ein UV-Spektrometer überwacht und aufgezeichnet. Die Fraktionen wurden anschließend mit Lämmli-Puffer vermengt, bei 95 °C für 5 Minuten erhitzt und für die Western Blot Analysen wie beschrieben benutzt. Kalibrierung erfolgte durch Aufzeichnung des Elutionsprofils eines Protein-Marker Gemisches (Dextran Blue [2000 kDa], Thyroglobulin [669 kDa], Ferretin [440 kDa], Katalase [230 kDa], Aldolase [158 kDa] und BSA [67 kDa]).

***In vitro* Protein-Bindungsanalysen**

In vitro Protein-Bindungsanalysen wurden mit rekombinanten Proteinen gebunden an Glutathion-Sepharose® (Amersham-Pharmacia) oder Nickel Sepharose (Qiagen) und gleichen Mengen an löslichen Bindungspartnern in PBS Puffer für eine Stunde bei 4 °C durchgeführt. Die Matrix wurden 4-mal in LS-Puffer gewaschen und die Proteine durch SDS-PAGE gefolgt von Coomassie BB Färbung, analysiert.

In vitro translatierte Proteine wurden durch *in vitro* Transkription und Translation mit dem „TnT Quick Coupled“ Reagenzsatz (Promega), in Gegenwart von ³⁵S-Methionin (Promix, Amersham) nach Angaben des Herstellers mit 40 µl Retikulozytenlysat und 0,5 µg Plasmid DNA pro Ansatz erzeugt. *In vitro* Bindungsstudien mit diesen markierten Proteinen wurden durch Inkubation von rekombinanter GST-Aurora-A, immobilisiert an Glutathion-Sepharose beziehungsweise TPX2, gebunden an Ni-Sepharose durchgeführt. Hierzu wurden die rekombinanten Proteine eine Stunde bei 4 °C mit den 1:3 in PBS verdünnten IVT Produkten inkubiert, welche zuvor für eine Stunde mit der entsprechenden Matrix bei 4 °C geklärt wurden. Die Matrix wurde 5-mal in LS-Puffer gewaschen und die Proteine durch SDS-PAGE, gefolgt von Coomassie BB Färbung, analysiert. Autoradiographien wurden mit einem PhosphorImager screen (Fuji) aufgenommen und die Daten mit der AIDA Software (Raytest GmbH) ausgewertet.

“Fishing” Experimente

Fishing Experimente mit rekombinanter GST-Aurora-A WT und KD wurden durch Inkubation von 2 µl Glutathion-Sepharose mit gebundenen, rekombinanten Proteinen (etwa 4 µg) in 500 µl mitotischen beziehungsweise Interphase-Extrakten von HeLa S3 Zellen (~18 µg/µl) durchgeführt. Die Extrakte wurden hierfür zuerst für eine Stunde bei 4 °C nur mit der Matrix inkubiert, bei 16.000 g abzentrifugiert und der Überstand mit der Aurora-A-Sepharose Matrix für 3 Stunden bei 4 °C unter Rotation inkubiert. Die präzipitierte Sepharose wurden 5-mal in LS Puffer gewaschen und in Protein-Auftragspuffer aufgenommen. Die Proben wurden für 5 Minuten bei 95 °C gekocht und durch SDS-PAGE gefolgt von Western Blotting analysiert.

Kinaseassays, Aktivierungsassays, PP1 Behandlung

Die Pufferbedingungen für Kinaseassays wurden in Vorversuchen optimiert. Es zeigte sich, dass ein HEPES basierendes Puffersystem nach (Bischoff et al., 1998) einem

Tris-HCl gepufferten System nach (Giet et al., 1999a) dahingehend überlegen ist, dass es unspezifische Phosphorylierungen (gesehen mit den Kinase K162R beads) besser zu unterdrücken vermochte (Daten nicht gezeigt). Daher wurde für alle Kinaseassays ein HEPES basierender Puffer nach Bischoff et al. (1998) verwendet.

Für *in vitro* Kinaseassays wurde aus Sf9 Zellen aufgereinigte rekombinante GST-Aurora-A WT und K162R, gebunden an Glutathion-Sepharose, verwendet. Die Kinase wurde zusammen mit einem molaren Überschuss des jeweiligen Substrats (typischerweise 2 µg) in einem Ansatz von 20 µl Kinase Puffer (KP) inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µCi [γ^{32} P]ATP und 10 µM ATP gestartet und für 30 Minuten bei 30 °C durchgeführt. Die Kinasereaktion wurde durch Zugabe von SDS-PAGE Proben-Puffer gestoppt. Die Proben wurden auf 12 % SDS-PAGE Gelen aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue (BB) gefärbt. Autoradiographien der getrockneten Gele wurden mit einem PhosphorImager Screen (FujiFilm) aufgezeichnet und mit der AIDA Software (Raytest GmbH) ausgewertet. Die Gele wurden zudem eingescannt um die Coomassie BB Färbung zu dokumentieren.

Kinaseassays mit immunpräzipitierter Kinase aus humanen Zellen wurden wie folgt durchgeführt: 293T Zellen wurden in 10 cm Kulturschalen kultiviert und mit myc-Aurora-A WT und myc-Aurora-A KD transfiziert (TK7, TK8). Die Zellen wurden durch Zugabe von Nocodazol (0,5 µg/ml) beziehungsweise Aphidicolin (1,6 µg/ml) im Zellzyklus arretiert. Zellen wurden geerntet und in 10 ml PBS mit 1 mM PMSF gewaschen und in 500 µl NP40 Puffer mit Proteaseinhibitoren und Phosphataseinhibitoren lysiert. Das Lysat wurde für 20 Minuten bei 16.000 g abzentrifugiert und der Überstand mit an Protein-G-Sepharose gebundenen myc-Antikörpern (9E10) versetzt. Diese wurden für 3 Stunden bei 4 °C inkubiert, die Matrix abzentrifugiert und 5-mal in LS-Puffer gewaschen.

In den Kinase-Aktivierungsassays wurde die mit Prescission-Protease geschnittene, freie Aurora-A aus Sf9 Zellen verwendet. Die Kinase wurde in 20 µl Ansätzen in Kinase-Puffer für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Kinase Reaktion durch Zugabe von 1 µCi [γ^{32} P]ATP und 10 µM ATP für 30 Minuten bei 30 °C durchgeführt. Paclitaxel stabilisierte Mikrotubuli beziehungsweise Tubulin wurden zu 2 µg Gesamtkonzentration verwendet. Die optimalen TPX2 und Aurora-A Konzentration wurden durch Titration für jede Aufreinigung bestimmt. 10 µg MBP wurde als Substrat pro Reaktion zugesetzt. Als Kontrolle wurden den Reaktionen anstelle der Mikrotubuli eine äquivalente Menge des Mikrotubuli-Puffer BRB80 zugegeben.

Mikrotubuli wurden durch sequentielle Taxol Zugabe aus isolierten, bovinen Tubulin (freundlicherweise von Dr. Thomas Meyer zur Verfügung gestellt) polymerisiert. Hierfür wurde das Protokoll des Mitchison-Labors (<http://mitchison.med.harvard.edu/Protocols.htm>) verwendet. Die Qualität der Mikrotubuli wurde durch Zugabe von Rhodamin markierten Tubulin durch Fluoreszenzmikroskopie kontrolliert. Tubulin-Polymere wurden in BRB80 bei Raumtemperatur aufbewahrt beziehungsweise schock-gefroren und bei -80 °C gelagert.

Die Behandlung bakterieller Aurora-A (etwa 6 µg) Kinase mit rekombinanter PP1 Phosphatase (NEB biolabs) wurde in 20 µl Kinase-Puffer für 30 Minuten bei 30 °C mit 2,5 U PP1 durchgeführt. Alternativ wurde die Kinase in Kinase-Puffer inkubiert beziehungsweise PP1 durch Zugabe von 0,1 µM Microcystin-LR inhibiert. Die Kinasereaktion wurde danach durch Zugabe von ATP gestartet und für 30 Minuten bei 30 °C durchgeführt. Zur Inhibition von PP1 wurde 0,1 µM Microcystin-LR allen Kinasereaktionen zugesetzt.

Phosphoaminosäurenanalyse

Phosphoaminosäurenanalysen wurden als zweidimensionale Elektrophorese auf Zellulose-Dünnschicht-Chromatographieplatten (20 x 20 cm, Merck) mit einem HTLE-7000 System (CBS Scientific) wie bei (Boyle et al., 1991) beschrieben durchgeführt.

Massenspektrometrische Verfahren

Proteinbanden in SDS-PAGE Gelen wurden ausgeschnitten und mit sequencing-grade porcine Trypsin (Promega) wie bei (Shevchenko et al., 1996) beschrieben behandelt. Peptide mass-fingerprinting wurde an einem MALDI-TOF Instrument (Reflex III; Bruker) durchgeführt und die Identität der Proteine über Wahrscheinlichkeits-basierte Datenbanksuchen bestimmt (Perkins et al., 1999).

Um Verunreinigungen durch Keratin zu unterbinden, wurde einer Produktschutzbank während der Handhabung der Gele verwendet, sowie 0,2 µm gefilterten Lösungen hergestellt.

Transfektion humaner Zellen

Humane Zellen wurden für Immunfluoreszenzanalysen durch Calcium-Phosphat-Präzipitation transfiziert. Die DNA wurde durch Zugabe von 1/3 Volumen 1 M CaCl₂ Lösung gefällt und 1:1 in 2x HBS (50 mM HEPES, 1,5 mM Na₂HPO₄, 280 mM NaCl, pH 7,05) aufgenommen und nach Inkubation für etwa 20 Minuten bei Raumtemperatur auf die Zellen gegeben. Für 2 ml Medium wurden hierbei 5 µg DNA verwendet. Nach 16 Stunden wurden die Zellen mehrmals mit PBS gewaschen.

Für größere Ansätze (wie Immunpräzipitationen) wurde die Zellen mit FuGene6 (Roche) transfiziert. Hierfür wurde die DNA 1:3 (Gewicht/Volumen) mit FuGene6 gemischt und in 100 µl Medium ohne Serum für 20 Minuten inkubiert, bevor diese auf die Zellen gegeben wurde. Für 2 ml Medium wurde 1 µg DNA verwendet.

siRNA Experimente

Für die siRNA Experimente wurden Oligonukleotide (Dharmacon Research, Inc.) mit den folgenden Sequenzen verwendet:

Aurora-A I	: 725AUG CCC UGU CUU ACU GUC A ₇₄₃
Aurora-A II	: 156U UCU UCC CAG CGC GUU CCU ₁₇₄
TPX2	: 144GAA UGG AAC UGG AGG GCU ₁₆₁
KIAA1007	: CAG AUC ACA AGG UGC CUA A
KIAA1741	: CAA UCU GGG CCU GAG GGA U

RNA-Duplexe wurden in 100 mM Kalium Acetate, 30 mM HEPES-KOH (pH 7,4), 2 mM Magnesium Acetate für 1 Minuten bei 90 °C und eine Stunde bei 37 °C „annealed“ und anschließend bei -80 °C gelagert. Oligos wurden mit Oligofectamine (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) in die Zellen transfiziert. Typischerweise wurden 4,5 µl des 20 µM siRNA Duplex mit 150 µl Opti-MEM (GibcoBRL, Karlsruhe, Germany) gemischt und 9 µl of Oligofectamine mit 36 µl Opti-MEM. Diese Lösungen wurden für 7–10 Minuten inkubiert, zusammengemischt und nochmals für 20–25 Minuten inkubiert, bevor sie zu den Zellen gegeben wurden. Als Kontrolle diente die GL2 Duplex (Elbashir et al., 2001), die gegen das Luciferase Gen gerichtet ist.

Immunfluoreszenz- und Dekonvolutions-Mikroskopie

Zellen wurden auf HCl behandelten Deckgläschen kultiviert und für 6 Minuten in - 20 °C kalten Methanol fixiert. Die Zellen wurden einmal in PBS gewaschen und für 30 Minuten mit 3 % BSA in PBS blockiert. Alternativ wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert um Aktin darzustellen. Hierzu wurden die Zellen in PBS gewaschen, für 5 Minuten in 3 % Paraformaldehyd in 2 % Saccharose fixiert. Nach erneuten waschen in PBS wurden die Zellen mit kalten 0,5 % Triton-X-100 für 5 Minuten permeabilisiert.

Für Experiment mit KIAA1741 wurde zudem alternativ eine Fixierung mit Pre-Extraktion verwendet. Hierbei wurden die Zellen für 5 Minuten mit 7,5 µg/ml Digitonin in KHM Puffer (25 mM Hepes-KOH, pH 7,2, 125 mM Kalium-Acetate, 2,5 mM Magnesium-Acetate) extrahiert und anschließend mit 3 % Paraformaldehyd in 2 % Saccharose fixiert.

Primäre und sekundäre Antikörper, wurden nacheinander in PBS mit 3 % BSA appliziert (siehe Tab. 8). Die Deckgläschen wurden in DABCO (90 % Glycerol, 2,5 % (Gewicht/Volumen) 1,4-Diazabicyclo(2,2,2)Octane (Sigma), in PBS pH 8.6) auf Objektträgern eingebettet.

Immunfluoreszenz-Mikroskopie wurde an einem Zeiss Axioplan II Mikroskop mit einem 63x Öl-Immersion Objektiv mit einer Apertur von 1,4 durchgeführt. Bilder wurden mit einer Micromax CCD Kamera (Princeton Instruments) und der Metaview (Universal Imaging Corp.) Software aufgenommen. Die Bearbeitung der Bilder erfolgte mit der Metaview Software und Adobe Photoshop 8.0 (Adobe Systems, Mountain View, CA).

Für Dekonvolutionsaufnahmen wurde ein Delta-Vision System, bestehend aus einem Nikon Eclipse TE200 Mikroskop in Kombination mit einer Photometrix Kamerasystem und einem Koordinatentische und der entsprechenden Software von Applied Precision, verwendet. Die elektronische Dekonvolution erfolgte mit 15 Zyklen bei Standard-Einstellung und Korrektur für das verwendete Objektiv.

Um optimale Ergebnisse zu erhalten wurde die geeignete Antikörperkonzentration für die Färbungen ermittelt und verschiedene Fixiermethoden getestet.

Für Immunfluoreszenz Analysen wurden folgende Antikörper in den angegebenen Konzentrationen verwendet:

Antigen	Tier	Western	IF	Quelle
Aurora-A	Kaninchen	0,06 µg/µl	0,03 µg/µl	Diese Arbeit
Aurora-A (IAK1)	Maus, mAk	1:300	1:200	Signal Transduction (NEB)
KIAA1741	Kaninchen	0,02 µg/µl	0,02 µg/µl	Diese Arbeit
TACC3	Kaninchen	~ 0,02 µg/µl	-	J. Raff
TPX2	Maus, mAk	1:10	1:2	H.J. Heidebrecht
TPX2	Kaninchen	0,02 µg/µl	0,02 µg/µl	O. Gruss
α-Tubulin	Maus mAk	1:1000	1:2000	Sigma-Aldrich
γ-Tubulin	Maus, mAk	-	1:1000	E. Nigg
Maus IgG TexasRed konjugiert	Ziege	-	1:1000	Sigma-Aldrich
Hasen IgG Alexa488 konjugiert	Ziege	-	1:1000	Molecular Probes
Myc (9E10)	Maus, mAk	1:2	1:2	Evan et al., 1985

Tab. 8 : Verwendete Antikörper. mAk : monoklonaler Antikörper.

DNA wurde mit DAPI (Sigma-Aldrich) (2 µg/ml) gefärbt, Aktin wurde mit Texas-Red konjugierten Phalloidin dargestellt.

Zellzyklus-Analysen

DNA Profile wurden von auf Deckgläsern fixierten Zellen durchgeführt. Zellen wurden für 5 Minuten mit Methanol fixiert und mit DAPI gefärbt. Die Aufnahme und Auswertung erfolgte auf einem Laser-Scanning-Cytometer (LSC) der Firma CompuCyte in Verbindung mit Software der Firma CompuCyte.

Ampflifikation der cDNA Bibliothek und Yeast Two Hybrid (Y2H) Screen

E.coli welche mit einer cDNA Bank von humaner fötalen Gehirn in pACT2 transformiert waren (Clontech, Matchmaker), wurden kommerziell erworben und auf 100 x 15 cm Agarplatten ausplattiert. Plasmid-DNA wurde mit einem Plasmid-Giga Präparations-Satz (Qiagen) isoliert. Hierbei wurden aus 10 g Bakterien-Nassgewicht typischerweise 3 mg Plasmid-DNA isoliert.

Der *Saccharomyces cerevisiae* Stamm PJ-69-4A wurde für den Y2H Screen verwendet. Die Transformation der Hefen wurde wie beschrieben durchgeführt (Ronald Agatep, 1998). Hierbei wurde zuerst das Bait-Konstrukt (TK39) transformiert und die so

erhaltenen Transformanten nach Wachstum auf LEU2 Marker selektiven Minimalmedium mit der cDNA Bank (pACT2) transformiert. Nach Transformation wurden die Hefen auf Minimalagar auf die beiden Selektionsmarker (LEU2 und URA3) der Plasmide sowie auf Interaktion über den ADE-Marker wie beschrieben selektioniert (Ronald Agatep, 1998). Nach 2 Wochen wurden die gewachsenen Kolonien noch mal auf LWA Platten und parallel auf LWH Platten ausgestrichen und anschließend die Plasmide aus diesen Zellen isoliert. Diese wurden durch Elektroporation in *E.coli* transformiert und erneut in Hefen mit dem Bait-Plasmid TK39 retransformiert. Nach positiver Selektion dieser Retransformanten wurden die cDNA-Inserts dieser Plasmide sequenziert.

Bioinformatik

Für die Planung von Klonierungen sowie das Erstellen von Alignments wurde die Software Sci Ed Central für Windows, Scientific & Educational Software verwendet.

Komplexe Alignments wurden mit CLUSTAL-W (Thompson et al., 1994) generiert. Für die Darstellung in Word wurden diese mit Chroma (Oxford University) editiert.

Für Homologie-Suchen von Proteinen und Nukleinsäuren wurde BLAST und PHI-BLAST auf den Servern des NCBI verwendet (Altschul et al., 1990; Altschul et al., 1997). Eine Homologie wurde als signifikant betrachtet, wenn Proteine zu über 18 % ähnlich sind (Reeck et al., 1987).

Für die Suche und Identifikation von Domänen und Mustern in Proteinen wurde ScanProsite mit der Prosite Datenbank verwendet (Sigrist et al., 2002) verwendet.

Literatur-Recherchen wurde mit Hilfe von PubMed (NCBI) und dem OPAC der Bayerischen Staatsbibliotheken (BSSB) vorgenommen.

Strukturen von Proteinen wurden mit Pymol™ Molecular Graphics Systems Vers. 0.9 (DeLano Scientific LLC) editiert und gerendert.

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Erich A. Nigg für die Vergabe dieser Arbeit und die Möglichkeit, diese weitgehend eigenverantwortlich an seinem Institut durchführen zu können. Herrn Dr. Herman Silljé danke ich für seine hervorragende fachliche und technische Betreuung. In geduldiger Weise hat er mich in die biochemische Arbeit mit Protein-Kinasen eingeführt. Allen Mitarbeitern des Institutes für Zellbiologie danke ich für hilfreiche Diskussionen und technische sowie soziale Unterstützung. Mein besonderer Dank gilt hierbei Herrn Dr. Volker Stucke. Herr Stucke ist mir über die Zeit ein guter Freund geworden und stand mir, als fachlich kompetenter Kollege und Freund stets mit Rat und Hilfe zur Seite. Das angenehme menschliche Umfeld im Labor, getragen vor allem von Volker Stucke, Arno Alpi, Christian Preisinger, Christoph Baumann und Roman Körner hat mir erlaubt mich schnell einzuleben und eine, trotz allem, schöne Zeit zu verbringen. Euch allen vielen Dank an dieser Stelle !

Dr. Roman Körner und Albert Ries danke ich herzlichst für die Einführung in massenspektrometrische Methoden und Hilfe bei deren Durchführung.

Desweiteren gilt mein Dank Herrn Dr. Jürgen Heidebrecht (Universität Kiel) für Ki-S2 Antikörper, Herrn Dr. Oliver Gruss (EMBL Heidelberg) für TPX2-Plasmide, Protein und Antikörper sowie zahlreiche Anregungen. Frau Dr. Susan Smith (New York University School of Medicine,) danke ich für das TAB182 (KIAA1741) Plasmid und Antikörper. Frau Dr. Isabel Vernos (EMBL Heidelberg) und Frau Dr. Terasa Sardon (EMBL Heidelberg) unterstützten die Arbeit durch hilfreiche und kritische Diskussionen.

Ich danke Herrn Dr. Stucke, Frau Dr. Grüneberg, Frau Dipl. Biol. Nieraad, Herrn Dr. Silljé und Herrn Dr. Neef und für die Durchsicht der Manuskripte. Vor allem die kritischen Korrekturen von Volker haben viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Diese Arbeit, sowie die daraus entstandenen Veröffentlichungen und Posterpräsentationen wurden durch die Max-Planck-Gesellschaft finanziell gefördert.

Letztendlich gilt mein Dank all denen, die es mir ermöglicht haben eine wissenschaftliche Karriere anzustreben und/oder dies unterstützten. Hier möchte ich mich vor allem bei meinen Eltern bedanken, welche mir ohne jeden Zwang die entsprechende Ausbildung ermöglichten.

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abbildungen

Abb. 1 : Zellteilung (Mitose) in tierischen Zellen, gesehen und gezeichnet vor über 150 Jahren.	6
Abb. 2 : Die Zellzyklusphasen.	7
Abb. 3 : Phasen und Ablauf der Mitose in tierischen Zellen.	9
Abb. 4 : Aufbau der mitotischen Spindel.	12
Abb. 5 : Schematischer Aufbau eines Centrosoms und der Centrosomen-Zyklus.	15
Abb. 6 : Dendrogramm Aurora(-A) homologer Proteine.	18
Abb. 7 : Struktur der humanen Aurora-A –B und –C Kinasen.	19
Abb. 8 : Schematische Darstellung der wichtigsten Regulationsmechanismen von Aurora-A.	26
Abb. 9 : Schematischer Aufbau der Aurora-A Kinase und Struktur der katalytischen Domäne.	28
Abb. 10 : Mutilpolare Spindeln können zu Aneuploidien führen.	32
Abb. 11 : Aufreinigung rekombinanter Aurora-A aus Sf9 Zellen.	38
Abb. 12 : Kinaseaktivität rekombinanter Aurora-A aus Sf9 Zellen.	39
Abb. 13 : Rekombinante Aurora-A-his aus <i>E.coli</i>	41
Abb. 14 : Autophosphorylierung rekombinanter Aurora-A.	42
Abb. 15 : Vergleich der Aurora-A Kinaseaktivität von mitotischen und Interphase-Zellen.	44
Abb. 16 : Charakterisierung des polyklonalen Aurora-A Antikörpers.	45
Abb. 17 : Subzelluläre Lokalisation von Aurora-A.	47
Abb. 18 : DNA Profil nach Aurora-A Depletion über siRNA.	48
Abb. 19 : siRNA von Aurora-A in HeLa S3 Zellen.	49
Abb. 20 : Aurora-A Co-Immunpräzipitation aus mitotischen Zellextrakten.	52
Abb. 21 : „Fishing“ Experiment mit rekombinanter Aurora-A Kinase (WT und KD).	54
Abb. 22 : Alignment von KIAA1007 und homologen Proteinen.	56
Abb. 23 : Lokalisation des partiellen carboxyterminalen KIAA1007 Proteins in U2OS Zellen.	56
Abb. 24 : KIAA1007 Co-Immunpräzipitation und <i>in vitro</i> Kinaseassays mit Aurora-A.	57
Abb. 25 : Charakterisierung des KIAA1741 Antikörpers.	60
Abb. 26 : KIAA1741 interagiert mit Aurora-A und ist zellzyklusunabhängig exprimiert.	61
Abb. 27 : KIAA1741 ist ein Substrat von Aurora-A.	63
Abb. 28 : Subzelluläre Lokalisation von KIAA1741.	65
Abb. 29 : siRNA Phänotyp von KIAA1741.	67
Abb. 30 : TPX2 ist ein Bindungspartner von Aurora-A.	69
Abb. 31 : Kartierung der Interaktionsdomänen in TPX2 und Aurora-A.	71
Abb. 32 : Aurora-A phosphoryliert TPX2 an Serin(en) im Aminoterminal.	74
Abb. 33 : TPX2 und Aurora-A Co-Lokalisation an der mitotischen Spindel.	75
Abb. 34 : Lokalisation von exprimierten myc-TPX2 Fragmenten in humanen Zellen.	77
Abb. 35 : TPX2 Depletion führt zu Spindeldefekten und mitotischem Arrest in HeLa S3 Zellen.	78
Abb. 36 : Die Lokalisation von Aurora-A ist abhängig von TPX2.	80
Abb. 37 : TPX2 steigert die Kinaseaktivität von Aurora-A.	82
Abb. 38 : TPX2 aktiviert Aurora-A über Bindung an die ersten 43 Aminosäuren von TPX2.	83
Abb. 39 : INCENP aktiviert Aurora-A und zeigt Sequenzähnlichkeiten zu TPX2.	84
Abb. 40 : Modellierung eines potentiellen Aurora Interaktionsmotifs.	97
Abb. 41 : Modell der Aktion von TPX2 an der mitotischen Spindel.	99

Tabellen

Tab. 1 : Zusammenfassung der wichtigsten Funktionen der Aurora und Aurora-B Kinasen.	24
Tab. 2 : Substrate und Bindungspartner von Aurora-A.	31
Tab. 3 : Aurora-A Status in ausgewählten humanen Tumoren.	34
Tab. 4 : In den Aurora-A Co-Immunpräzipitationen identifizierte Proteine.	53
Tab. 5 : In dieser Arbeit verwendete Zelllinien.	105
Tab. 6 : In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide.	106
Tab. 7 : Verwendete Plasmide.	109
Tab. 8 : Verwendete Antikörper. mAk : monoklonaler Antikörper.	120

Literaturverzeichnis

- Adams,R.R., Carmena,M. und Earnshaw,W.C. (2001a). Chromosomal passengers and the (aurora) ABCs of mitosis. *Trends Cell Biol.* *11*, 49-54.
- Adams,R.R., Eckley,D.M., Vagnarelli,P., Wheatley,S.P., Gerloff,D.L., Mackay,A.M., Svingen,P.A., Kaufmann,S.H. und Earnshaw,W.C. (2001b). Human INCENP colocalizes with the Aurora-B/AIRK2 kinase on chromosomes and is overexpressed in tumour cells. *Chromosoma* *110*, 65-74.
- Adams,R.R., Maiato,H., Earnshaw,W.C. und Carmena,M. (2001c). Essential roles of *Drosophila* inner centromere protein (INCENP) and aurora B in histone H3 phosphorylation, metaphase chromosome alignment, kinetochore disjunction, and chromosome segregation. *J. Cell Biol.* *153*, 865-880.
- Adams,R.R., Wheatley,S.P., Gouldsworthy,A.M., Kandels-Lewis,S.E., Carmena,M., Smythe,C., Gerloff,D.L. und Earnshaw,W.C. (2000). INCENP binds the Aurora-related kinase AIRK2 and is required to target it to chromosomes, the central spindle and cleavage furrow. *Curr. Biol.* *10*, 1075-1078.
- Alberts,B., Johnson,A., Lewis,J., Raff,M., Roberts,K. und Walter,P. (2002). *Molecular biology of the cell.* (New York: Garland Science).
- Altschul,S.F., Gish,W., Miller,W., Myers,E.W. und Lipman,D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* *215*, 403-410.
- Altschul,S.F., Madden,T.L., Schaffer,A.A., Zhang,J., Zhang,Z., Miller,W. und Lipman,D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* *25*, 3389-3402.
- Anand,S., Penrhyn-Lowe,S. und Venkitaraman,A.R. (2003). AURORA-A amplification overrides the mitotic spindle assembly checkpoint, inducing resistance to Taxol. *Cancer Cell* *3*, 51-62.
- Andersen,J.S., Wilkinson,C.J., Mayor,T., Mortensen,P., Nigg,E.A. und Mann,M. (2003). Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling. *Nature* *426*, 570-574.
- Andersen,S.S. und Wittmann,T. (2002). Toward reconstitution of in vivo microtubule dynamics in vitro. *Bioessays* *24*, 305-307.
- Andrews,P.D., Knatko,E., Moore,W.J. und Swedlow,J.R. (2003). Mitotic mechanics: the auroras come into view. *Curr. Opin. Cell Biol.* *15*, 672-683.
- Arlot-Bonnemains,Y., Klotzbucher,A., Giet,R., Uzbekov,R., Bihan,R. und Prigent,C. (2001). Identification of a functional destruction box in the *Xenopus laevis* aurora-A kinase pEg2. *FEBS Lett.* *508*, 149-152.
- Askjaer,P., Galy,V., Hannak,E. und Mattaj,I.W. (2002). Ran GTPase cycle and importins alpha and beta are essential for spindle formation and nuclear envelope assembly in living *Caenorhabditis elegans* embryos. *Mol. Biol. Cell* *13*, 4355-4370.
- Avery,O.T., MacLeod,C.M. und McCarty,M. (1944). *J Exp. Med.* *79*.
- Bar-Shira,A., Pinthus,J.H., Rozovsky,U., Goldstein,M., Sellers,W.R., Yaron,Y., Eshhar,Z. und Orr-Urtreger,A. (2002). Multiple genes in human 20q13 chromosomal region are involved in an advanced prostate cancer xenograft. *Cancer Res.* *62*, 6803-6807.
- Bayliss,R., Sardon,T., Vernos,I. und Conti,E. (2003). Structural Basis of Aurora-A Activation by TPX2 at the Mitotic Spindle. *Mol. Cell* *12*, 851-862.
- Berdnik,D. und Knoblich,J.A. (2002). *Drosophila* Aurora-A is required for centrosome maturation and actin-dependent asymmetric protein localization during mitosis. *Curr. Biol.* *12*, 640-647.

- Bernard,M., Sanseau,P., Henry,C., Couturier,A. und Prigent,C. (1998). Cloning of STK13, a third human protein kinase related to *Drosophila* aurora and budding yeast Ipl1 that maps on chromosome 19q13.3-ter. *Genomics* 53, 406-409.
- Biggins,S., Severin,F.F., Bhalla,N., Sassoon,I., Hyman,A.A. und Murray,A.W. (1999). The conserved protein kinase Ipl1 regulates microtubule binding to kinetochores in budding yeast. *Genes Dev.* 13, 532-544.
- Biggins,S. und Murray,A.W. (2001). The budding yeast protein kinase Ipl1/Aurora allows the absence of tension to activate the spindle checkpoint. *Genes Dev.* 15, 3118-3129.
- Biggins,S. und Walczak,C.E. (2003). Captivating capture: how microtubules attach to kinetochores. *Curr. Biol.* 13, R449-R460.
- Bischoff,J.R., Anderson,L., Zhu,Y., Mossie,K., Ng,L., Souza,B., Schryver,B., Flanagan,P., Clairvoyant,F., Ginther,C., Chan,C.S., Novotny,M., Slamon,D.J. und Plowman,G.D. (1998). A homologue of *Drosophila* aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *EMBO J.* 17, 3052-3065.
- Bischoff,J.R. und Plowman,G.D. (1999). The Aurora/Ipl1p kinase family: regulators of chromosome segregation and cytokinesis. *Trends Cell Biol.* 9, 454-459.
- Bishop,J.D. und Schumacher,J.M. (2002). Phosphorylation of the carboxyl terminus of inner centromere protein (INCENP) by the Aurora B Kinase stimulates Aurora B kinase activity. *J. Biol. Chem.* 277, 27577-27580.
- Blagden,S.P. und Glover,D.M. (2003). Polar expeditions - provisioning the centrosome for mitosis. *Nat. Cell Biol.* 5, 505-511.
- Blangy,A., Lane,H.A., d'Herin,P., Harper,M., Kress,M. und Nigg,E.A. (1995). Phosphorylation by p34cdc2 regulates spindle association of human Eg5, a kinesin-related motor essential for bipolar spindle formation in vivo. *Cell* 83, 1159-1169.
- Bolton,M.A., Lan,W., Powers,S.E., McClelland,M.L., Kuang,J. und Stukenberg,P.T. (2002). Aurora B kinase exists in a complex with survivin and INCENP and its kinase activity is stimulated by survivin binding and phosphorylation. *Mol. Biol. Cell* 13, 3064-3077.
- Borel,F., Lohez,O.D., Lacroix,F.B. und Margolis,R.L. (2002). Multiple centrosomes arise from tetraploidy checkpoint failure and mitotic centrosome clusters in p53 and RB pocket protein-compromised cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 9819-9824.
- Bornens,M., Paintrand,M., Berges,J., Marty,M.C. und Karsenti,E. (1987). Structural and chemical characterization of isolated centrosomes. *Cell Motil. Cytoskeleton* 8, 238-249.
- Boveri,T. (1888). Zellenstudien II. Die Befruchtung und Teilung des Eies von *Ascaris megalocephala*. *Jena Zeit. Naturw.* 22, 685-882.
- Boveri,T. (1914). Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren. (Jena: Verlag von Gustav Fischer), pp. 1-64.
- Boyle,W.J., van der,G.P. und Hunter,T. (1991). Phosphopeptide mapping and phosphoamino acid analysis by two-dimensional separation on thin-layer cellulose plates. *Methods Enzymol.* 201:110-49., 110-149.
- Buvelot,S., Tatsutani,S.Y., Vermaak,D. und Biggins,S. (2003). The budding yeast Ipl1/Aurora protein kinase regulates mitotic spindle disassembly. *J. Cell Biol.* 160, 329-339.
- Carmena,M. und Earnshaw,W.C. (2003). The cellular geography of aurora kinases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 842-854.
- Cassimeris,L. und Spittle,C. (2001). Regulation of microtubule-associated proteins. *Int. Rev. Cytol.* 210:163-226., 163-226.

- Castro,A., Arlot-Bonnemains,Y., Vigneron,S., Labbe,J.C., Prigent,C. und Lorca,T. (2002a). APC/Fizzy-Related targets Aurora-A kinase for proteolysis. *EMBO Rep.* 3, 457-462.
- Castro,A., Mandart,E., Lorca,T. und Galas,S. (2003). Involvement of Aurora A Kinase during Meiosis I-II Transition in *Xenopus* Oocytes. *J. Biol. Chem.* 278, 2236-2241.
- Castro,A., Vigneron,S., Bernis,C., Labbe,J.C., Prigent,C. und Lorca,T. (2002b). The D-Box-activating domain (DAD) is a new proteolysis signal that stimulates the silent D-Box sequence of Aurora-A. *EMBO Rep.* 3, 1209-1214.
- Chan,C.S. und Botstein,D. (1993). Isolation and characterization of chromosome-gain and increase-in-ploidy mutants in yeast. *Genetics* 135, 677-691.
- Chang,P., Giddings,T.H., Jr., Winey,M. und Stearns,T. (2003). Epsilon-tubulin is required for centriole duplication and microtubule organization. *Nat. Cell Biol.* 5, 71-76.
- Cheeseman,I.M., Anderson,S., Jwa,M., Green,E.M., Kang,J., Yates,J.R., III, Chan,C.S., Drubin,D.G. und Barnes,G. (2002). Phospho-regulation of kinetochore-microtubule attachments by the Aurora kinase Iplp. *Cell* 111, 163-172.
- Cheetham,G.M., Knegt,R.M., Coll,J.T., Renwick,S.B., Swenson,L., Weber,P., Lippke,J.A. und Austen,D.A. (2002). Crystal structure of aurora-2, an oncogenic serine/threonine kinase. *J. Biol. Chem.* 277, 42419-42422.
- Chen,J., Jin,S., Tahir,S.K., Zhang,H., Liu,X., Sarthy,A.V., McGonigal,T.P., Liu,Z., Rosenberg,S.H. und Ng,S.C. (2003). Survivin enhances Aurora-B kinase activity and localizes Aurora-B in human cells. *J. Biol. Chem.* 278, 486-490.
- Chen,S.S., Chang,P.C., Cheng,Y.W., Tang,F.M. und Lin,Y.S. (2002). Suppression of the STK15 oncogenic activity requires a transactivation-independent p53 function. *EMBO J.* 21, 4491-4499.
- Clarke,D.J. und Gimenez-Abian,J.F. (2000). Checkpoints controlling mitosis. *Bioessays* 22, 351-363.
- Compton,D.A. (2000). Spindle assembly in animal cells. *Annu. Rev. Biochem.* 69:95-114., 95-114.
- Conte,N., Delaval,B., Ginestier,C., Ferrand,A., Isnardon,D., Larroque,C., Prigent,C., Seraphin,B., Jacquemier,J. und Birnbaum,D. (2003). TACC1-chTOG-Aurora A protein complex in breast cancer. *Oncogene* 22, 8102-8116.
- Crosio,C., Fimia,G.M., Loury,R., Kimura,M., Okano,Y., Zhou,H., Sen,S., Allis,C.D. und Sassone-Corsi,P. (2002). Mitotic phosphorylation of histone H3: spatio-temporal regulation by mammalian Aurora kinases. *Mol. Cell Biol.* 22, 874-885.
- Cross,S.M., Sanchez,C.A., Morgan,C.A., Schimke,M.K., Ramel,S., Idzerda,R.L., Raskind,W.H. und Reid,B.J. (1995). A p53-dependent mouse spindle checkpoint. *Science* 267, 1353-1356.
- D'Assoro,A.B., Lingle,W.L. und Salisbury,J.L. (2002). Centrosome amplification and the development of cancer. *Oncogene* 21, 6146-6153.
- Dasso,M. (2002). The Ran GTPase: theme and variations. *Curr. Biol.* 12, R502-R508.
- Desai,A. und Mitchison,T.J. (1997). Microtubule polymerization dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13:83-117., 83-117.
- Dictenberg,J.B., Zimmerman,W., Sparks,C.A., Young,A., Vidair,C., Zheng,Y., Carrington,W., Fay,F.S., and Doxsey,S.J. (1998). Pericentrin and gamma-tubulin form a protein complex and are organized into a novel lattice at the centrosome. *J Cell Biol.* 141, 163-174.

- Ditchfield,C., Johnson,V.L., Tighe,A., Ellston,R., Haworth,C., Johnson,T., Mortlock,A., Keen,N. Taylor,S.S. (2003). Aurora B couples chromosome alignment with anaphase by targeting BubR1, Mad2, and Cenp-E to kinetochores. *J. Cell Biol.* *161*, 267-280.
- Diviani,D. und Scott,J.D. (2001). AKAP signaling complexes at the cytoskeleton. *J. Cell Sci.* *114*, 1431-1437.
- Doxsey,S. (2001). Re-evaluating centrosome function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *2*, 688-698.
- Du,J. und Hannon,G.J. (2002). The centrosomal kinase Aurora-A/STK15 interacts with a putative tumor suppressor NM23-H1. *Nucleic Acids Res.* *30*, 5465-5475.
- Dutertre,S., Descamps,S. und Prigent,C. (2002). On the role of aurora-A in centrosome function. *Oncogene* *21*, 6175-6183.
- Ehara,H., Yokoi,S., Tamaki,M., Nishino,Y., Takahashi,Y., Deguchi,T., Kimura,M., Yoshioka,T. und Okano,Y. (2003). Expression of mitotic Aurora/Ipl1p-related kinases in renal cell carcinomas: an immunohistochemical study. *Urol. Res.* *31*, 382-386.
- Elbashir,S.M., Harborth,J., Lendeckel,W., Yalcin,A., Weber,K. und Tuschl,T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* *411*, 494-498.
- Evan,G.I., Lewis,G.K., Ramsay,G. und Bishop,J.M. (1985). Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Mol. Cell Biol.* *5*, 3610-3616.
- Ewart-Toland,A., Briassouli,P., De Koning,J.P., Mao,J.H., Yuan,J., Chan,F., MacCarthy-Morrogh,L., Ponder,B.A., Nagase,H., Burn,J., Ball,S., Almeida,M., Linardopoulos,S. und Balmain,A. (2003). Identification of Stk6/STK15 as a candidate low-penetrance tumor-susceptibility gene in mouse and human. *Nat. Genet.* *34*, 403-412.
- Eyers,P.A., Erikson,E., Chen,L.G. und Maller,J.L. (2003). A novel mechanism for activation of the protein kinase aurora a. *Curr. Biol.* *13*, 691-697.
- Eyers,P.A. und Maller,J.L. (2003). Regulation of xenopus aurora A activation by TPX2. *J Biol. Chem.* In press
- Faragher,A.J. und Fry,A.M. (2003). Nek2A kinase stimulates centrosome disjunction and is required for formation of bipolar mitotic spindles. *Mol. Biol. Cell* *14*, 2876-2889.
- Farruggio,D.C., Townsley,F.M. und Ruderman,J.V. (1999). Cdc20 associates with the kinase aurora2/Aik. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *96*, 7306-7311.
- Finlay,C.A., Hinds,P.W. und Levine,A.J. (1989). The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* *57*, 1083-1093.
- Flemming W. (1882). *Zellsubstanz, Kern und Zelltheilung.* (Leipzig: F.C.W. Vogel).
- Flemming,W. (1875). Studien über die Entwicklungsgeschichte der Najaden. In *Sitzungsbericht Akad Wissensch Wien.* 81-147.
- Francis,S.E. und Davis,T.N. (2000). The spindle pole body of *Saccharomyces cerevisiae*: architecture and assembly of the core components. *Curr. Top. Dev. Biol.* *49*:105-32., 105-132.
- Francisco,L. und Chan,C.S. (1994). Regulation of yeast chromosome segregation by Ipl1 protein kinase and type 1 protein phosphatase. *Cell Mol. Biol. Res.* *40*, 207-213.
- Francisco,L., Wang,W. und Chan,C.S. (1994). Type 1 protein phosphatase acts in opposition to IpL1 protein kinase in regulating yeast chromosome segregation. *Mol. Cell Biol.* *14*, 4731-4740.

- Frank-Vaillant,M., Haccard,O., Thibier,C., Ozon,R., Arlot-Bonnemains,Y., Prigent,C. und Jessus,C. (2000). Progesterone regulates the accumulation and the activation of Eg2 kinase in *Xenopus* oocytes. *J. Cell Sci.* *113*, 1127-1138.
- Fry,A.M. (2002). The Nek2 protein kinase: a novel regulator of centrosome structure. *Oncogene* *21*, 6184-6194.
- Garcia,A., Cayla,X., Guernon,J., Dessauge,F., Hospital,V., Rebollo,M.P., Fleischer,A. und Rebollo,A. (2003). Serine/threonine protein phosphatases PP1 and PP2A are key players in apoptosis. *Biochimie* *85*, 721-726.
- Garrett,S., Auer,K., Compton,D.A. und Kapoor,T.M. (2002). hTPX2 is required for normal spindle morphology and centrosome integrity during vertebrate cell division. *Curr. Biol.* *12*, 2055-2059.
- Gergely,F. (2002). Centrosomal TACCtics. *Bioessays* *24*, 915-925.
- Gergely,F., Karlsson,C., Still,I., Cowell,J., Kilmartin,J. und Raff,J.W. (2000). The TACC domain identifies a family of centrosomal proteins that can interact with microtubules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *97*, 14352-14357.
- Ghadimi,B.M., Sackett,D.L., Difilippantonio,M.J., Schrock,E., Neumann,T., Jauho,A., Auer,G. und Ried,T. (2000). Centrosome amplification and instability occurs exclusively in aneuploid, but not in diploid colorectal cancer cell lines, and correlates with numerical chromosomal aberrations. *Genes Chromosomes. Cancer* *27*, 183-190.
- Giet,R. und Glover,D.M. (2001). *Drosophila* aurora B kinase is required for histone H3 phosphorylation and condensin recruitment during chromosome condensation and to organize the central spindle during cytokinesis. *J. Cell Biol.* *152*, 669-682.
- Giet,R., McLean,D., Descamps,S., Lee,M.J., Raff,J.W., Prigent,C. und Glover,D.M. (2002). *Drosophila* Aurora A kinase is required to localize D-TACC to centrosomes and to regulate astral microtubules. *J. Cell Biol.* *156*, 437-451.
- Giet,R. und Prigent,C. (1999). Aurora/Ipl1p-related kinases, a new oncogenic family of mitotic serine-threonine kinases. *J. Cell Sci.* *112*, 3591-3601.
- Giet,R. und Prigent,C. (2000). The *Xenopus laevis* aurora/Ipl1p-related kinase pEg2 participates in the stability of the bipolar mitotic spindle. *Exp. Cell Res.* *258*, 145-151.
- Giet,R. und Prigent,C. (2001). The non-catalytic domain of the *Xenopus laevis* auroraA kinase localises the protein to the centrosome. *J. Cell Sci.* *114*, 2095-2104.
- Giet,R., Uzbekov,R., Cubizolles,F., Le Guellec,K. und Prigent,C. (1999a). The *Xenopus laevis* aurora-related protein kinase pEg2 associates with and phosphorylates the kinesin-related protein XIEg5. *J. Biol. Chem.* *274*, 15005-15013.
- Giet,R., Uzbekov,R., Kireev,I. und Prigent,C. (1999b). The *Xenopus laevis* centrosome aurora/Ipl1-related kinase. *Biol. Cell* *91*, 461-470.
- Gigoux,V., L'Hoste,S., Raynaud,F., Camonis,J. und Garbay,C. (2002). Identification of Aurora kinases as RasGAP Src homology 3 domain-binding proteins. *J. Biol. Chem.* *277*, 23742-23746.
- Glötzter,M. (2001). Animal cell cytokinesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *17*:351-86., 351-386.
- Glötzter,M., Murray,A.W. und Kirschner,M.W. (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* *349*, 132-138.
- Glover,D.M., Leibowitz,M.H., McLean,D.A. und Parry,H. (1995). Mutations in aurora prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles. *Cell* *81*, 95-105.

- Goepfert,T.M., Adigun,Y.E., Zhong,L., Gay,J., Medina,D. und Brinkley,W.R. (2002). Centrosome amplification and overexpression of aurora A are early events in rat mammary carcinogenesis. *Cancer Res.* 62, 4115-4122.
- Gonzalez,C. (2002). Aurora-A in cell fate control. *Sci. STKE.* 2002, E48.
- Gorbsky,G.J. (2001). The mitotic spindle checkpoint. *Curr. Biol.* 11, R1001-R1004.
- Goto,H., Yasui,Y., Kawajiri,A., Nigg,E.A., Terada,Y., Tatsuka,M., Nagata,K. und Inagaki,M. (2003). Aurora-B regulates the cleavage furrow-specific vimentin phosphorylation in the cytokinetic process. *J. Biol. Chem.* 278, 8526-8530.
- Goto,H., Yasui,Y., Nigg,E.A. und Inagaki,M. (2002). Aurora-B phosphorylates Histone H3 at serine28 with regard to the mitotic chromosome condensation. *Genes Cells* 7, 11-17.
- Goyal,R.K., Lin,P., Kanungo,J., Payne,A.S., Muslin,A.J. und Longmore,G.D. (1999). Ajuba, a novel LIM protein, interacts with Grb2, augments mitogen-activated protein kinase activity in fibroblasts, and promotes meiotic maturation of *Xenopus* oocytes in a Grb2- and Ras-dependent manner. *Mol. Cell Biol.* 19, 4379-4389.
- Gritsko,T.M., Coppola,D., Paciga,J.E., Yang,L., Sun,M., Shelley,S.A., Fiorica,J.V., Nicosia,S.V. und Cheng,J.Q. (2003). Activation and Overexpression of Centrosome Kinase BTAK/Aurora-A in Human Ovarian Cancer. *Clin. Cancer Res.* 9, 1420-1426.
- Gruss,O.J., Carazo-Salas,R.E., Schatz,C.A., Guarguaglini,G., Kast,J., Wilm,M., Le Bot,N., Vernos,I., Karsenti,E. und Mattaj,I.W. (2001). Ran induces spindle assembly by reversing the inhibitory effect of importin alpha on TPX2 activity. *Cell* 104, 83-93.
- Gruss,O.J., Wittmann,M., Yokoyama,H., Pepperkok,R., Kufer,T., Sillje,H., Karsenti,E., Mattaj,I.W. und Vernos,I. (2002). Chromosome-induced microtubule assembly mediated by TPX2 is required for spindle formation in HeLa cells. *Nat. Cell Biol.* 4, 871-879.
- Hamada,M., Yakushijin,Y., Ohtsuka,M., Kakimoto,M., Yasukawa,M. und Fujita,S. (2003). Aurora2/BTAK/STK15 is involved in cell cycle checkpoint and cell survival of aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Br. J. Haematol.* 121, 439-447.
- Hanahan,D. und Weinberg,R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Hanks,S.K., Quinn,A.M. und Hunter,T. (1988). The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 241, 42-52.
- Hannak,E., Kirkham,M., Hyman,A.A. und Oegema,K. (2001). Aurora-A kinase is required for centrosome maturation in *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Biol.* 155, 1109-1116.
- Hartwell,L.H. und Weinert,T.A. (1989). Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246, 629-634.
- Hauf,S., Cole,R.W., LaTerra,S., Zimmer,C., Schnapp,G., Walter,R., Heckel,A., Van Meel,J., Rieder,C.L. und Peters,J.M. (2003). The small molecule Hesperadin reveals a role for Aurora B in correcting kinetochore-microtubule attachment and in maintaining the spindle assembly checkpoint. *J Cell Biol.* 161, 281-294.
- Haydon,C.E., Eyers,P.A., Aveline-Wolf,L.D., Resing,K.A., Maller,J.L. und Ahn,N.G. (2003). Identification of novel phosphorylation sites on *Xenopus laevis* Aurora A and analysis of phosphopeptide enrichment by immobilized metal-affinity chromatography. *Mol. Cell Proteomics.* 2, 1055-1067.
- Heidebrecht,H.J., Adam-Klages,S., Szczepanowski,M., Pollmann,M., Buck,F., Endl,E., Kruse,M.L., Rudolph,P. und Parwaresch,R. (2003). repp86: A Human Protein Associated in the Progression of Mitosis. *Mol. Cancer Res.* 1, 271-279.

- Heidebrecht,H.J., Buck,F., Steinmann,J., Sprenger,R., Wacker,H.H. und Parwaresch,R. (1997). p100: a novel proliferation-associated nuclear protein specifically restricted to cell cycle phases S, G2, and M. *Blood* 90, 226-233.
- Hirota,T., Kunitoku,N., Sasayama,T., Marumoto,T., Zhang,D., Nitta,M., Hatakeyama,K. und Saya,H. (2003). Aurora-A and an interacting activator, the LIM protein Ajuba, are required for mitotic commitment in human cells. *Cell* 114, 585-598.
- Hodgman,R., Tay,J., Mendez,R. und Richter,J.D. (2001). CPEB phosphorylation and cytoplasmic polyadenylation are catalyzed by the kinase IAK1/Eg2 in maturing mouse oocytes. *Development* 128, 2815-2822.
- Honda,K., Mihara,H., Kato,Y., Yamaguchi,A., Tanaka,H., Yasuda,H., Furukawa,K. und Urano,T. (2000). Degradation of human Aurora2 protein kinase by the anaphase-promoting complex-ubiquitin-proteasome pathway. *Oncogene* 19, 2812-2819.
- Honda,R., Korner,R. und Nigg,E.A. (2003). Exploring the Functional Interactions between Aurora B, INCENP, and Survivin in Mitosis. *Mol. Biol. Cell* 14, 3325-3341.
- Huang,Y.S., Jung,M.Y., Sarkissian,M. und Richter,J.D. (2002). N-methyl-D-aspartate receptor signaling results in Aurora kinase-catalyzed CPEB phosphorylation and alpha CaMKII mRNA polyadenylation at synapses. *EMBO J.* 21, 2139-2148.
- Jackman,M., Lindon,C., Nigg,E.A. und Pines,J. (2003). Active cyclin B1-Cdk1 first appears on centrosomes in prophase. *Nat. Cell Biol.* 5, 143-148.
- Jiang,Y., Zhang,Y., Lees,E. und Seghezzi,W. (2003). AuroraA overexpression overrides the mitotic spindle checkpoint triggered by nocodazole, a microtubule destabilizer. *Oncogene* 22, 8293-8301.
- Johnson,L.N., Noble,M.E. und Owen,D.J. (1996). Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell* 85, 149-158.
- Joshi,H.C., Palacios,M.J., McNamara,L. und Cleveland,D.W. (1992). Gamma-tubulin is a centrosomal protein required for cell cycle-dependent microtubule nucleation. *Nature* 356, 80-83.
- Kalab,P., Weis,K. und Heald,R. (2002). Visualization of a Ran-GTP gradient in interphase and mitotic *Xenopus* egg extracts. *Science* 295, 2452-2456.
- Kallio,M.J., McClelland,M.L., Stukenberg,P.T. und Gorbsky,G.J. (2002). Inhibition of aurora B kinase blocks chromosome segregation, overrides the spindle checkpoint, and perturbs microtubule dynamics in mitosis. *Curr. Biol.* 12, 900-905.
- Kang,J., Cheeseman,I.M., Kallstrom,G., Velmurugan,S., Barnes,G. und Chan,C.S. (2001). Functional cooperation of Dam1, Ipl1, and the inner centromere protein (INCENP)-related protein Sli15 during chromosome segregation. *J. Cell Biol.* 155, 763-774.
- Kanungo,J., Pratt,S.J., Marie,H. und Longmore,G.D. (2000). Ajuba, a cytosolic LIM protein, shuttles into the nucleus and affects embryonal cell proliferation and fate decisions. *Mol. Biol. Cell* 11, 3299-3313.
- Karsenti,E. und Vernos,I. (2001). The mitotic spindle: a self-made machine. *Science* 294, 543-547.
- Katayama,H., Brinkley,W.R. und Sen,S. (2003). The Aurora kinases: role in cell transformation and tumorigenesis. *Cancer Metastasis Rev.* 22, 451-464.
- Katayama,H., Sasai,K., Kawai,H., Yuan,Z.M., Bondaruk,J., Suzuki,F., Fujii,S., Arlinghaus,R.B., Czerniak,B.A. und Sen,S. (2004). Phosphorylation by aurora kinase A induces Mdm2-mediated destabilization and inhibition of p53. *Nat. Genet.* 36, 55-62.

- Katayama,H., Zhou,H., Li,Q., Tatsuka,M. und Sen,S. (2001). Interaction and feedback regulation between STK15/BTAK/Aurora-A kinase and protein phosphatase 1 through mitotic cell division cycle. *J. Biol. Chem.* 276, 46219-46224.
- Kawajiri,A., Yasui,Y., Goto,H., Tatsuka,M., Takahashi,M., Nagata,K. und Inagaki,M. (2003). Functional significance of the specific sites phosphorylated in desmin at cleavage furrow: Aurora-B may phosphorylate and regulate type III intermediate filaments during cytokinesis coordinatedly with Rho-kinase. *Mol. Biol. Cell* 14, 1489-1500.
- Kellogg,D.R., Moritz,M. und Alberts,B.M. (1994). The centrosome and cellular organization. *Annu. Rev. Biochem.* 63:639-74., 639-674.
- Keryer,G., Di Fiore,B., Celati,C., Lehtreck,K.F., Mogensen,M., Delougee,A., Lavia,P., Bornens,M. und Tassin,A.M. (2003). Part of Ran Is Associated with AKAP450 at the Centrosome: Involvement in Microtubule-organizing Activity. *Mol. Biol. Cell* 14, 4260-4271.
- Khodjakov,A. und Rieder,C.L. (2001). Centrosomes enhance the fidelity of cytokinesis in vertebrates and are required for cell cycle progression. *J. Cell Biol.* 153, 237-242.
- Kiat,L.S., Hui,K.M. und Gopalan,G. (2002). Aurora-A kinase interacting protein (AIP), a novel negative regulator of human Aurora-A kinase. *J. Biol. Chem.* 277, 45558-45565.
- Kim,J.H., Kang,J.S. und Chan,C.S. (1999). Sli15 associates with the ipl1 protein kinase to promote proper chromosome segregation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 145, 1381-1394.
- Kimura,M., Kotani,S., Hattori,T., Sumi,N., Yoshioka,T., Todokoro,K. und Okano,Y. (1997a). Cell cycle-dependent expression and spindle pole localization of a novel human protein kinase, Aik, related to Aurora of *Drosophila* and yeast Ipl1. *J. Biol. Chem.* 272, 13766-13771.
- Kimura,M., Matsuda,Y., Eki,T., Yoshioka,T., Okumura,K., Hanaoka,F. und Okano,Y. (1997b). Assignment of STK6 to human chromosome 20q13.2-->q13.3 and a pseudogene STK6P to 1q41-->q42. *Cytogenet. Cell Genet.* 79, 201-203.
- Kimura,M., Matsuda,Y., Yoshioka,T. und Okano,Y. (1999). Cell cycle-dependent expression and centrosome localization of a third human aurora/Ipl1-related protein kinase, AIK3. *J. Biol. Chem.* 274, 7334-7340.
- Kimura,M., Matsuda,Y., Yoshioka,T., Sumi,N. und Okano,Y. (1998). Identification and characterization of STK12/Aik2: a human gene related to aurora of *Drosophila* and yeast IPL1. *Cytogenet. Cell Genet.* 82, 147-152.
- King,R.W., Glotzer,M. und Kirschner,M.W. (1996). Mutagenic analysis of the destruction signal of mitotic cyclins and structural characterization of ubiquitinated intermediates. *Mol. Biol. Cell* 7, 1343-1357.
- Kinoshita,K., Arnal,I., Desai,A., Drechsel,D.N. und Hyman,A.A. (2001). Reconstitution of physiological microtubule dynamics using purified components. *Science* 294, 1340-1343.
- Kirschner,M.W. und Mitchison,T. (1986). Microtubule dynamics. *Nature* 324, 621.
- Kunitoku,N., Sasayama,T., Marumoto,T., Zhang,D., Honda,S., Kobayashi,O., Hatakeyama,K., Ushio,Y., Saya,H. und Hirota,T. (2003). CENP-A Phosphorylation by Aurora-A in Prophase Is Required for Enrichment of Aurora-B at Inner Centromeres and for Kinetochore Function. *Dev. Cell* 5, 853-864.
- Laemmli,U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lane,D.P. (1992). Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358, 15-16.
- Larsson,N., Marklund,U., Gradin,H.M., Brattsand,G. und Gullberg,M. (1997). Control of microtubule dynamics by oncoprotein 18: dissection of the regulatory role of multisite phosphorylation during mitosis. *Mol. Cell Biol.* 17, 5530-5539.

- Lee,M.J., Gergely,F., Jeffers,K., Peak-Chew,S.Y. und Raff,J.W. (2001). Msps/XMAP215 interacts with the centrosomal protein D-TACC to regulate microtubule behaviour. *Nat. Cell Biol.* 3, 643-649.
- Lengauer,C., Kinzler,K.W. und Vogelstein,B. (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396, 643-649.
- Lens,S.M., Wolthuis,R.M., Klompmaker,R., Kauw,J., Agami,R., Brummelkamp,T., Kops,G. und Medema,R.H. (2003). Survivin is required for a sustained spindle checkpoint arrest in response to lack of tension. *EMBO J.* 22, 2934-2947.
- Li,D., Zhu,J., Firozi,P.F., Abbruzzese,J.L., Evans,D.B., Cleary,K., Friess,H. und Sen,S. (2003). Overexpression of oncogenic STK15/BTAK/Aurora A kinase in human pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res.* 9, 991-997.
- Lingle,W.L., Barrett,S.L., Negron,V.C., D'Assoro,A.B., Boeneman,K., Liu,W., Whitehead,C.M., Reynolds,C. und Salisbury,J.L. (2002). Centrosome amplification drives chromosomal instability in breast tumor development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 1978-1983.
- Lingle,W.L. und Salisbury,J.L. (1999). Altered centrosome structure is associated with abnormal mitoses in human breast tumors. *Am. J. Pathol.* 155, 1941-1951.
- Littlepage,L.E. und Ruderman,J.V. (2002). Identification of a new APC/C recognition domain, the A box, which is required for the Cdh1-dependent destruction of the kinase Aurora-A during mitotic exit. *Genes Dev.* 16, 2274-2285.
- Littlepage,L.E., Wu,H., Andresson,T., Deanehan,J.K., Amundadottir,L.T. und Ruderman,J.V. (2002). Identification of phosphorylated residues that affect the activity of the mitotic kinase Aurora-A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 15440-15445.
- Manda,R., Kohno,T., Matsuno,Y., Takenoshita,S., Kuwano,H. und Yokota,J. (1999). Identification of genes (SPON2 and C20orf2) differentially expressed between cancerous and noncancerous lung cells by mRNA differential display. *Genomics* 61, 5-14.
- Marie,H., Pratt,S.J., Betson,M., Epple,H., Kittler,J.T., Meek,L., Moss,S.J., Troyanovsky,S., Attwell,D., Longmore,G.D. und Braga,V.M. (2003). The LIM protein Ajuba is recruited to cadherin-dependent cell junctions through an association with alpha-catenin. *J. Biol. Chem.* 278, 1220-1228.
- Marumoto,T., Hirota,T., Morisaki,T., Kunitoku,N., Zhang,D., Ichikawa,Y., Sasayama,T., Kuninaka,S., Mimori,T., Tamaki,N., Kimura,M., Okano,Y. und Saya,H. (2002). Roles of aurora-A kinase in mitotic entry and G2 checkpoint in mammalian cells. *Genes Cells* 7, 1173-1182.
- Marumoto,T., Honda,S., Hara,T., Nitta,M., Hirota,T., Kohmura,E. und Saya,H. (2003). Aurora-a kinase maintains the fidelity of early and late mitotic events in HeLa cells. *J Biol. Chem.* 278, 51786-51795.
- Maton,G., Thibier,C., Castro,A., Lorca,T., Prigent,C. und Jesus,C. (2003). Cdc2-Cyclin B triggers H3 kinase activation of aurora-A in xenopus oocytes. *J. Biol. Chem.* 278, 21439-21449.
- Matsumoto,Y. und Maller,J.L. (2002). Calcium, calmodulin, and CaMKII requirement for initiation of centrosome duplication in Xenopus egg extracts. *Science* 295, 499-502.
- Mayer,T.U., Kapoor,T.M., Haggarty,S.J., King,R.W., Schreiber,S.L. und Mitchison,T.J. (1999). Small molecule inhibitor of mitotic spindle bipolarity identified in a phenotype-based screen. *Science* 286, 971-974.
- Mayor,T., Hacker,U., Stierhof,Y.D. und Nigg,E.A. (2002). The mechanism regulating the dissociation of the centrosomal protein C-Nap1 from mitotic spindle poles. *J Cell Sci.* 115, 3275-3284.
- Mayor,T., Meraldi,P., Stierhof,Y.D., Nigg,E.A. und Fry,A.M. (1999). Protein kinases in control of the centrosome cycle. *FEBS Lett.* 452, 92-95.

- McIntosh, J.R., Grishchuk, E.L. und West, R.R. (2002). Chromosome-microtubule interactions during mitosis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 18:193-219, 193-219.
- Mendez, R., Hake, L.E., Andresson, T., Littlepage, L.E., Ruderman, J.V. und Richter, J.D. (2000). Phosphorylation of CPE binding factor by Eg2 regulates translation of c-mos mRNA. *Nature* 404, 302-307.
- Meraldi, P., Honda, R. und Nigg, E.A. (2002). Aurora-A overexpression reveals tetraploidization as a major route to centrosome amplification in p53^{-/-} cells. *EMBO J.* 21, 483-492.
- Meraldi, P., Lukas, J., Fry, A.M., Bartek, J. und Nigg, E.A. (1999). Centrosome duplication in mammalian somatic cells requires E2F and Cdk2-cyclin A. *Nat. Cell Biol.* 1, 88-93.
- Meraldi, P. und Nigg, E.A. (2002). The centrosome cycle. *FEBS Lett.* 521, 9-13.
- Merdes, A., Ramyar, K., Vechio, J.D. und Cleveland, D.W. (1996). A complex of NuMA and cytoplasmic dynein is essential for mitotic spindle assembly. *Cell* 87, 447-458.
- Minoshima, Y., Kawashima, T., Hirose, K., Tonozuka, Y., Kawajiri, A., Bao, Y.C., Deng, X., Tatsuka, M., Narumiya, S., May, W.S., Jr., Nosaka, T., Semba, K., Inoue, T., Satoh, T., Inagaki, M. und Kitamura, T. (2003). Phosphorylation by aurora B converts MgcRacGAP to a RhoGAP during cytokinesis. *Dev. Cell* 4, 549-560.
- Mishima, M., Kaitna, S. und Glotzer, M. (2002). Central spindle assembly and cytokinesis require a kinesin-like protein/RhoGAP complex with microtubule bundling activity. *Dev. Cell* 2, 41-54.
- Miyoshi, Y., Iwao, K., Egawa, C. und Noguchi, S. (2001). Association of centrosomal kinase STK15/BTAK mRNA expression with chromosomal instability in human breast cancers. *Int. J. Cancer* 92, 370-373.
- Morgan, D.O. (1997). Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13, 261-291.
- Mountain, V., Simerly, C., Howard, L., Ando, A., Schatten, G. und Compton, D.A. (1999). The kinesin-related protein, HSET, opposes the activity of Eg5 and cross-links microtubules in the mammalian mitotic spindle. *J Cell Biol.* 147, 351-366.
- Murray, A.W. (1992). Creative blocks: cell-cycle checkpoints and feedback controls. *Nature* 359, 599-604.
- Nachury, M.V., Maresca, T.J., Salmon, W.C., Waterman-Storer, C.M., Heald, R. und Weis, K. (2001). Importin beta is a mitotic target of the small GTPase Ran in spindle assembly. *Cell* 104, 95-106.
- Nedelec, F. (2002). Computer simulations reveal motor properties generating stable antiparallel microtubule interactions. *J. Cell Biol.* 158, 1005-1015.
- Nedelec, F., Surrey, T. und Karsenti, E. (2003). Self-organisation and forces in the microtubule cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 118-124.
- Nedelec, F.J., Surrey, T., Maggs, A.C. und Leibler, S. (1997). Self-organization of microtubules and motors. *Nature* 389, 305-308.
- Neef, R., Preisinger, C., Sutcliffe, J., Kopajtich, R., Nigg, E.A., Mayer, T.U. und Barr, F.A. (2003). Phosphorylation of mitotic kinesin-like protein 2 by polo-like kinase 1 is required for cytokinesis. *J Cell Biol.* 162, 863-875.
- Nigg, E.A. (1995). Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bioessays* 17, 471-480.
- Nigg, E.A. (2001). Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 21-32.
- Nigg, E.A. (2002). Centrosome aberrations: cause or consequence of cancer progression? *Nat. Rev. Cancer* 2, 815-825.

- Nigg, E.A., Blangy, A. und Lane, H.A. (1996). Dynamic changes in nuclear architecture during mitosis: on the role of protein phosphorylation in spindle assembly and chromosome segregation. *Exp. Cell Res.* 229, 174-180.
- Nowakowski, J., Cronin, C.N., McRee, D.E., Knuth, M.W., Nelson, C.G., Pavletich, N.P., Rogers, J., Sang, B.C., Scheibe, D.N., Swanson, R.V. und Thompson, D.A. (2002). Structures of the Cancer-Related Aurora-A, FAK, and EphA2 Protein Kinases from Nanovolume Crystallography. *Structure*. 10, 1659-1667.
- O'Connell, K.F., Caron, C., Kopish, K.R., Hurd, D.D., Kemphues, K.J., Li, Y. und White, J.G. (2001). The *C. elegans* zyg-1 gene encodes a regulator of centrosome duplication with distinct maternal and paternal roles in the embryo. *Cell* 105, 547-558.
- Ota, T., Suto, S., Katayama, H., Han, Z.B., Suzuki, F., Maeda, M., Tanino, M., Terada, Y. und Tatsuka, M. (2002). Increased mitotic phosphorylation of histone H3 attributable to AIM-1/Aurora-B overexpression contributes to chromosome number instability. *Cancer Res.* 62, 5168-5177.
- Ou, Y.Y. und Rattner, J.B. (2002). Post-karyokinesis centrosome movement leaves a trail of unanswered questions. *Cell Motil. Cytoskeleton* 51, 123-132.
- Pan, J. und Snell, W.J. (2000). Regulated targeting of a protein kinase into an intact flagellum. An aurora/Ipl1p-like protein kinase translocates from the cell body into the flagella during gamete activation in *Chlamydomonas*. *J. Biol. Chem.* 275, 24106-24114.
- Pan, J. und Snell, W.J. (2003). Kinesin II and regulated intraflagellar transport of *Chlamydomonas* aurora protein kinase. *J. Cell Sci.* 116, 2179-2186.
- Paris, J. und Philippe, M. (1990). Poly(A) metabolism and polysomal recruitment of maternal mRNAs during early *Xenopus* development. *Dev. Biol.* 140, 221-224.
- Paweletz, N. (2001). Walther Flemming: pioneer of mitosis research. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 72-75.
- Perkins, D.N., Pappin, D.J., Creasy, D.M. und Cottrell, J.S. (1999). Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20, 3551-3567.
- Peters, J.M. (2002). The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Mol. Cell* 9, 931-943.
- Petersen, J. und Hagan, I.M. (2003). *S. pombe* Aurora Kinase/Survivin Is Required for Chromosome Condensation and the Spindle Checkpoint Attachment Response. *Curr. Biol.* 13, 590-597.
- Petersen, J., Paris, J., Willer, M., Philippe, M. und Hagan, I.M. (2001). The *S. pombe* aurora-related kinase Ark1 associates with mitotic structures in a stage dependent manner and is required for chromosome segregation. *J. Cell Sci.* 114, 4371-4384.
- Pfleger, C.M. und Kirschner, M.W. (2000). The KEN box: an APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1. *Genes Dev.* 14, 655-665.
- Piekorz, R.P., Hoffmeyer, A., Dunsch, C.D., McKay, C., Nakajima, H., Sexl, V., Snyder, L., Reh, J. und Ihle, J.N. (2002). The centrosomal protein TACC3 is essential for hematopoietic stem cell function and genetically interfaces with p53-regulated apoptosis. *EMBO J* 21, 653-664.
- Piel, M., Nordberg, J., Euteneuer, U. und Bornens, M. (2001). Centrosome-dependent exit of cytokinesis in animal cells. *Science* 291, 1550-1553.
- Pihan, G.A., Wallace, J., Zhou, Y. und Doxsey, S.J. (2003). Centrosome abnormalities and chromosome instability occur together in pre-invasive carcinomas. *Cancer Res.* 63, 1398-1404.
- Pines, J. (1999). Four-dimensional control of the cell cycle. *Nat. Cell Biol.* 1, E73-E79.

- Pines, J. und Rieder, C.L. (2001). Re-staging mitosis: a contemporary view of mitotic progression. *Nat. Cell Biol.* 3, E3-E6.
- Preble, A.M., Giddings, T.M., Jr. und Dutcher, S.K. (2000). Basal bodies and centrioles: their function and structure. *Curr. Top. Dev. Biol.* 49:207-33., 207-233.
- Purohit, A., Tynan, S.H., Vallee, R. und Doxsey, S.J. (1999). Direct interaction of pericentrin with cytoplasmic dynein light intermediate chain contributes to mitotic spindle organization. *J Cell Biol.* 147, 481-492.
- Rajagopalan, H., Nowak, M.A., Vogelstein, B. und Lengauer, C. (2003). The significance of unstable chromosomes in colorectal cancer. *Nat. Rev. Cancer* 3, 695-701.
- Reeck, G.R., de Haen, C., Teller, D.C., Doolittle, R.F., Fitch, W.M., Dickerson, R.E., Chambon, P., McLachlan, A.D., Margoliash, E., Jukes, T.H. (1987). "Homology" in proteins and nucleic acids: a terminology muddle and a way out of it. *Cell* 50, 667.
- Rieder, C.L. und Salmon, E.D. (1998). The vertebrate cell kinetochore and its roles during mitosis. *Trends Cell Biol.* 8, 310-318.
- Roghi, C., Giet, R., Uzbekov, R., Morin, N., Chartrain, I., Le Guellec, R., Couturier, A., Doree, M., Philippe, M. und Prigent, C. (1998). The *Xenopus* protein kinase pEg2 associates with the centrosome in a cell cycle-dependent manner, binds to the spindle microtubules and is involved in bipolar mitotic spindle assembly. *J. Cell Sci.* 111, 557-572.
- Ronald Agatep, Robert D. Kirkpatrick Debra L. Parchaliuk Robin A. Woods und R. Daniel Giet. (1998) Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by the lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol protocol. Technical Tips Online .
- Sakai, H., Urano, T., Ookata, K., Kim, M.H., Hirai, Y., Saito, M., Nojima, Y. und Ishikawa, F. (2002). MBD3 and HDAC1, two components of the NuRD complex, are localized at Aurora-A-positive centrosomes in M phase. *J. Biol. Chem.* 277, 48714-48723.
- Sakakura, C., Hagiwara, A., Yasuoka, R., Fujita, Y., Nakanishi, M., Masuda, K., Shimomura, K., Nakamura, Y., Inazawa, J., Abe, T. und Yamagishi, H. (2001). Tumour-amplified kinase BTAK is amplified and overexpressed in gastric cancers with possible involvement in aneuploid formation. *Br. J. Cancer* 84, 824-831.
- Salisbury, J.L. (2003). Centrosomes: coiled-coils organize the cell center. *Curr. Biol.* 13, R88-R90.
- Salisbury, J.L., Suino, K.M., Busby, R. und Springett, M. (2002). Centrin-2 is required for centriole duplication in mammalian cells. *Curr. Biol.* 12, 1287-1292.
- Sambrook J, Russell DW, Irwin N und Janssen KA (2001). *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Saraste, M., Sibbald, P.R. und Wittinghofer, A. (1990). The P-loop--a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem. Sci.* 15, 430-434.
- Sbodio, J.I. und Chi, N.W. (2002). Identification of a tankyrase-binding motif shared by IRAP, TAB182, and human TRF1 but not mouse TRF1. NuMA contains this RXXPDG motif and is a novel tankyrase partner. *J. Biol. Chem.* 277, 31887-31892.
- Schatz, C.A., Santarella, R., Hoenger, A., Karsenti, E., Mattaj, I.W., Gruss, O.J. und Carazo-Salas, R.E. (2003). Importin alpha-regulated nucleation of microtubules by TPX2. *EMBO J.* 22, 2060-2070.
- Schiebel, E. (2000). gamma-tubulin complexes: binding to the centrosome, regulation and microtubule nucleation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 113-118.
- Schliwa, M. und Woehlke, G. (2003). Molecular motors. *Nature* 422, 759-765.

- Schnackenberg,B.J. und Palazzo,R.E. (1999). Identification and function of the centrosome centromatrix. *Biol. Cell* 91, 429-438.
- Scholey,J.M., Brust-Mascher,I. und Mogilner,A. (2003). Cell division. *Nature* 422, 746-752.
- Schumacher,J.M., Ashcroft,N., Donovan,P.J. und Golden,A. (1998). A highly conserved centrosomal kinase, AIR-1, is required for accurate cell cycle progression and segregation of developmental factors in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Development* 125, 4391-4402.
- Seimiya,H. und Smith,S. (2002). The telomeric poly(ADP-ribose) polymerase, tankyrase 1, contains multiple binding sites for telomeric repeat binding factor 1 (TRF1) and a novel acceptor, 182-kDa tankyrase-binding protein (TAB182). *J. Biol. Chem.* 277, 14116-14126.
- Sen,S., Zhou,H. und White,R.A. (1997). A putative serine/threonine kinase encoding gene BTAK on chromosome 20q13 is amplified and overexpressed in human breast cancer cell lines. *Oncogene* 14, 2195-2200.
- Sen,S., Zhou,H., Zhang,R.D., Yoon,D.S., Vakar-Lopez,F., Ito,S., Jiang,F., Johnston,D., Grossman,H.B., Ruifrok,A.C., Katz,R.L., Brinkley,W. und Czerniak,B. (2002). Amplification/overexpression of a mitotic kinase gene in human bladder cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 94, 1320-1329.
- Shah,J.V. und Cleveland,D.W. (2000). Waiting for anaphase: Mad2 and the spindle assembly checkpoint. *Cell* 103, 997-1000.
- Shang,C., Hazbun,T.R., Cheeseman,I.M., Aranda,J., Fields,S., Drubin,D.G. und Barnes,G. (2003). Kinetochore Protein Interactions and their Regulation by the Aurora Kinase Ipl1p. *Mol. Biol. Cell* 14, 3342-3355.
- Sharp,D.J., Rogers,G.C. und Scholey,J.M. (2000). Microtubule motors in mitosis. *Nature* 407, 41-47.
- Shevchenko,A., Wilm,M., Vorm,O. und Mann,M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 68, 850-858.
- Shin,S.O., Lee,K.H., Kim,J.H., Baek,S.H., Park,J.W., Gabrielson,E.W. und Kwon,T.K. (2000). Alternative splicing in 5'-untranslational region of STK-15 gene, encoding centrosome associated kinase, in breast cancer cell lines. *Exp. Mol. Med.* 32, 193-196.
- Sigrist,C.J., Cerutti,L., Hulo,N., Gattiker,A., Falquet,L., Pagni,M., Bairoch,A. und Bucher,P. (2002). PROSITE: a documented database using patterns and profiles as motif descriptors. *Brief. Bioinform.* 3, 265-274.
- Sillibourne,J.E., Milne,D.M., Takahashi,M., Ono,Y. und Meek,D.W. (2002). Centrosomal anchoring of the protein kinase CK1delta mediated by attachment to the large, coiled-coil scaffolding protein CG-NAP/AKAP450. *J. Mol. Biol.* 322, 785-797.
- Smith,A.P., Gimenez-Abian,J.F. und Clarke,D.J. (2002). DNA-damage-independent checkpoints: yeast and higher eukaryotes. *Cell Cycle* 1, 16-33.
- Smith,S. und de Lange,T. (1999). Cell cycle dependent localization of the telomeric PARP, tankyrase, to nuclear pore complexes and centrosomes. *J. Cell Sci.* 112, 3649-3656.
- Stenoién,D.L., Sen,S., Mancini,M.A. und Brinkley,B.R. (2003). Dynamic association of a tumor amplified kinase, Aurora-A, with the centrosome and mitotic spindle. *Cell Motil. Cytoskeleton* 55, 134-146.
- Stevenson,V.A., Kramer,J., Kuhn,J. und Theurkauf,W.E. (2001). Centrosomes and the Scrambled protein coordinate microtubule-independent actin reorganization. *Nat. Cell Biol.* 3, 68-75.
- Taguchi,S., Honda,K., Sugiura,K., Yamaguchi,A., Furukawa,K. und Urano,T. (2002). Degradation of human Aurora-A protein kinase is mediated by hCdh1. *FEBS Lett.* 519, 59-65.

- Takada,S., Kelkar,A. und Theurkauf,W.E. (2003). Drosophila checkpoint kinase 2 couples centrosome function and spindle assembly to genomic integrity. *Cell* 113, 87-99.
- Takahashi,T., Haruki,N., Nomoto,S., Masuda,A., Saji,S., Osada,H. und Takahashi,T. (1999). Identification of frequent impairment of the mitotic checkpoint and molecular analysis of the mitotic checkpoint genes, hsMAD2 and p55CDC, in human lung cancers. *Oncogene* 18, 4295-4300.
- Tanaka,M., Ueda,A., Kanamori,H., Ideguchi,H., Yang,J., Kitajima,S. und Ishigatsubo,Y. (2002a). Cell-cycle-dependent regulation of human aurora A transcription is mediated by periodic repression of E4TF1. *J. Biol. Chem.* 277, 10719-10726.
- Tanaka,T., Kimura,M., Matsunaga,K., Fukada,D., Mori,H. und Okano,Y. (1999). Centrosomal kinase AIK1 is overexpressed in invasive ductal carcinoma of the breast. *Cancer Res.* 59, 2041-2044.
- Tanaka,T.U., Rachidi,N., Janke,C., Pereira,G., Galova,M., Schiebel,E., Stark,M.J. und Nasmyth,K. (2002b). Evidence that the Ipl1-Sli15 (Aurora kinase-INCENP) complex promotes chromosome bi-orientation by altering kinetochore-spindle pole connections. *Cell* 108, 317-329.
- Tanner,M.M., Tirkkonen,M., Kallioniemi,A., Collins,C., Stokke,T., Karhu,R., Kowbel,D., Shadravan,F., Hintz,M., Kuo,W.L. (1994). Increased copy number at 20q13 in breast cancer: defining the critical region and exclusion of candidate genes. *Cancer Res.* 54, 4257-4260.
- Tanner,M.M., Tirkkonen,M., Kallioniemi,A., Holli,K., Collins,C., Kowbel,D., Gray,J.W., Kallioniemi,O.P. und Isola,J. (1995). Amplification of chromosomal region 20q13 in invasive breast cancer: prognostic implications. *Clin. Cancer Res.* 1, 1455-1461.
- Tatsuka,M., Katayama,H., Ota,T., Tanaka,T., Odashima,S., Suzuki,F. und Terada,Y. (1998). Multinuclearity and increased ploidy caused by overexpression of the aurora- and Ipl1-like midbody-associated protein mitotic kinase in human cancer cells. *Cancer Res.* 58, 4811-4816.
- Terada,Y., Tatsuka,M., Suzuki,F., Yasuda,Y., Fujita,S. und Otsu,M. (1998). AIM-1: a mammalian midbody-associated protein required for cytokinesis. *EMBO J.* 17, 667-676.
- Terada,Y., Uetake,Y. und Kuriyama,R. (2003). Interaction of Aurora-A and centrosomin at the microtubule-nucleating site in Drosophila and mammalian cells. *J Cell Biol.* 162, 757-763.
- Thompson,J.D., Higgins,D.G. und Gibson,T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680.
- Tien,A.C., Lin,M.H., Su,L.J., Hong,Y.R., Cheng,T.S., Lee,Y.C., Lin,W.J., Still,I.H. und Huang,C.Y. (2003). Identification of the substrates and interaction proteins of Aurora kinases from a protein-protein interaction model. *Mol. Cell Proteomics*. In press.
- Tournebise,R., Popov,A., Kinoshita,K., Ashford,A.J., Rybina,S., Pozniakovsky,A., Mayer,T.U., Walczak,C.E., Karsenti,E. und Hyman,A.A. (2000). Control of microtubule dynamics by the antagonistic activities of XMAP215 and XKCM1 in Xenopus egg extracts. *Nat. Cell Biol.* 2, 13-19.
- Towbin,H., Staehelin,T. und Gordon,J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 76, 4350-4354.
- Trieselmann,N., Armstrong,S., Rauw,J. und Wilde,A. (2003). Ran modulates spindle assembly by regulating a subset of TPX2 and Kid activities including Aurora A activation. *J Cell Sci.* 116, 4791-4798.
- Trieselmann,N. und Wilde,A. (2002). Ran localizes around the microtubule spindle in vivo during mitosis in Drosophila embryos. *Curr. Biol.* 12, 1124-1129.
- Tsai,M.Y., Wiese,C., Cao,K., Martin,O., Donovan,P., Ruderman,J., Prigent,C. und Zheng,Y. (2003). A Ran signalling pathway mediated by the mitotic kinase Aurora A in spindle assembly. *Nat. Cell Biol.* 5, 242-248.

- Vorobjev, I.A. und Nadezhkina, E.S. (1987). The centrosome and its role in the organization of microtubules. *Int. Rev. Cytol.* 106:227-93., 227-293.
- Wahl, G.M. und Carr, A.M. (2001). The evolution of diverse biological responses to DNA damage: insights from yeast and p53. *Nat. Cell Biol.* 3, E277-E286.
- Walczak, C.E. (2000). Microtubule dynamics and tubulin interacting proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 52-56.
- Walter, A.O., Seghezzi, W., Korver, W., Sheung, J. und Lees, E. (2000). The mitotic serine/threonine kinase Aurora2/AIK is regulated by phosphorylation and degradation. *Oncogene* 19, 4906-4916.
- Wheatley, S.P., Carvalho, A., Vagnarelli, P. und Earnshaw, W.C. (2001). INCENP is required for proper targeting of Survivin to the centromeres and the anaphase spindle during mitosis. *Curr. Biol.* 11, 886-890.
- Wiese, C., Wilde, A., Moore, M.S., Adam, S.A., Merdes, A. und Zheng, Y. (2001). Role of importin-beta in coupling Ran to downstream targets in microtubule assembly. *Science* 291, 653-656.
- Wiese, C. und Zheng, Y. (1999). Gamma-tubulin complexes and their interaction with microtubule-organizing centers. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9, 250-259.
- Winey, M. (1999). Cell cycle: driving the centrosome cycle. *Curr. Biol.* 9, R449-R452.
- Wittmann, T., Boleti, H., Antony, C., Karsenti, E. und Vernos, I. (1998). Localization of the kinesin-like protein Xklp2 to spindle poles requires a leucine zipper, a microtubule-associated protein, and dynein. *J. Cell Biol.* 143, 673-685.
- Wittmann, T., Hyman, A. und Desai, A. (2001). The spindle: a dynamic assembly of microtubules and motors. *Nat. Cell Biol.* 3, E28-E34.
- Wittmann, T., Wilm, M., Karsenti, E. und Vernos, I. (2000). TPX2, A novel xenopus MAP involved in spindle pole organization. *J. Cell Biol.* 149, 1405-1418.
- Wyllie, A.H., Kerr, J.F. und Currie, A.R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* 68:251-306., 251-306.
- Yao, L.J., Zhong, Z.S., Zhang, L.S., Chen, D.Y., Schatten, H. und Sun, Q.Y. (2003). Aurora-A Is a Critical Regulator of Microtubule Assembly and Nuclear Activity in Mouse Oocytes, Fertilized Eggs, and Early Embryos. *Biol. Reprod. In press.*
- Yu, H. (2002). Regulation of APC-Cdc20 by the spindle checkpoint. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, 706-714.
- Zachariae, W. und Nasmyth, K. (1999). Whose end is destruction: cell division and the anaphase-promoting complex. *Genes Dev.* 13, 2039-2058.
- Zeitlin, S.G., Shelby, R.D. und Sullivan, K.F. (2001). CENP-A is phosphorylated by Aurora B kinase and plays an unexpected role in completion of cytokinesis. *J. Cell Biol.* 155, 1147-1157.
- Zeng, C. (2000). NuMA: a nuclear protein involved in mitotic centrosome function. *Microsc. Res. Tech.* 49, 467-477.
- Zhang, Y., Heidebrecht, H., Rott, A., Schlegelberger, B. und Parwaresch, R. (1999). Assignment of human proliferation associated p100 gene (C20orf1) to human chromosome band 20q11.2 by in situ hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.* 84, 182-183.
- Zhou, H., Kuang, J., Zhong, L., Kuo, W.L., Gray, J.W., Sahin, A., Brinkley, B.R. und Sen, S. (1998). Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. *Nat. Genet.* 20, 189-193.

Anhang I (CV)

Curriculum Vitae

Name	Thomas Alexander Kufer
Geburtsdatum	15. July 1974
Geburtsort	München
Nationalität	deutsch
Familienstand	ledig

Vorbildung und Akademischer Werdegang

1985 - 1994	Gymnasium Starnberg, Abschluss Abitur
1994 - 1995	Wehrdienst Bundeswehrapotheke Landsberg
1995 - 2000	Studium der Biologie , Ludwig-Maximilians-Universität München
Herbst 1998	Praktikumsaufenthalt Sainsbury Laboratory John Innes Center, Norwich UK; Prof. Dr. D. Baulcombe (Studien zur Funktion der Rx vermittelten Resistenz in Tabak)
Nov. 1999 - Aug. 2000	Diplomarbeit „Identifikation molekularer Komponenten des Zytoskeletts in <i>Ustilago maydis</i> “ Institut für Genetik, LMU, München Dr. G. Steinberg / Prof. Dr. R. Kahmann
Sept. 2000	Diplom in Biologie der Ludwig Maximilian Universität München Note : 1,0 (mit Auszeichnung) Prüfungsfächer : Genetik, Immunologie, Zellbiologie, Pharmakologie und Toxikologie, Biochemie
Jan. 2001 – Jan. 2004	Doktorarbeit „Regulation der humanen Aurora-A Kinase und Identifikation potentieller Interaktionspartner“ Institut für Zellbiologie Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried Prof. Dr. Erich A. Nigg
Ab Juni 2004	Postdoc Insitut Pasteur Paris Innate Immunity and Cell Signalling Dr. Dana Philpott

Preise und Auszeichnungen

- Mai 1995 "Jugend forscht", Landeswettbewerb Bayern
(„Einfluss elektromagnetischer Felder auf Organismen“)
- July 1995 „Von Martius Umweltpreis der GSF“; Fachbereich Physik

Fremdsprachenkenntnisse

- Deutsch : Muttersprache
- Englisch : fließend in Wort und Schrift
- Französisch : Sehr gute Kenntnisse in Schrift und Konversation
- Spanisch : Grundkenntnisse

Gemeinnütziges Engagement

- 1990 - 2004 Mitglied der Freiwilligen Feuerwehr Starnberg
- 1995 - 2000 Aktives Mitglied der Fachschaft Biologie, LMU München
- 1997 - 1999 Fachschaftssprecher der Fachschaft Biologie
- 2002 – 2004 Schriftführer eines örtlichen Sportschützenvereins (FSG Starnberg)

Wissenschaftliche Publikationen

Artikel / Schriften

1. “Regulation of Aurora-A kinase on the mitotic spindle”
Kufer T.A., Nigg EA, Sillje HH;
Chromosoma. 2003; 112(4):159-163
2. “Human TPX2 is required for targeting Aurora-A kinase to the spindle”
Kufer T.A., H.H.Sillje, R.Korner, O.J.Gruss, P.Meraldi und E.A.Nigg
The Journal of Cell Biology. 2002; 158:617-623
3. “Chromosome-induced microtubule assembly mediated by TPX2 is required for spindle formation in HeLa cells”
Gruss,O.J., M.Wittmann, H.Yokoyama, R.Pepperkok, T.Kufer, H.Sillje, E.Karsenti, I.W.Mattaj und I.Vernos.
Nature Cell Biology. 2002; 4:871-879
4. „Identification of molecular components of the cytoskeleton in *Ustilago maydis*”,
Kufer T.A. ; Insitut für Genetik, Ludwig Maximilians Universität München, 2000

Poster Präsentationen

2002

EMBO/EMBL Conference on Centrosomes and spindle pole bodies
(Heidelberg, Germany)

Poster Präsentation “TPX2 targets Aurora-A to the spindle”

Zusammenfassung siehe **Cell Motility and the Cytoskeleton. 2003 Feb;54(2):148-94**

Jacques-Monod Conference – CNRS “The Cell Cycle and its Checkpoints”
(Roscoff, France)

Poster Präsentation “TPX2 targets Aurora-A to the spindle”

2003

ELSO Meeting 2003
(Dresden, Germany)

Poster Präsentation “Human TPX2 activates and localizes Aurora-A to the spindle”

Martinsried, Januar 2004



Anhang II (Veröffentlichungen)

“Human TPX2 is required for targeting
Aurora-A kinase to the spindle”

Kufer et al.

The Journal of Cell Biology

2002

Human TPX2 is required for targeting Aurora-A kinase to the spindle

Thomas A. Kufer,¹ Herman H.W. Silljé,¹ Roman Körner,¹ Oliver J. Gruss,² Patrick Meraldi,¹ and Erich A. Nigg¹

¹Max Planck Institute of Biochemistry, Department of Cell Biology, D-82152 Martinsried, Germany

²European Molecular Biology Laboratory, D-69117 Heidelberg, Germany

Aurora-A is a serine-threonine kinase implicated in the assembly and maintenance of the mitotic spindle. Here we show that human Aurora-A binds to TPX2, a prominent component of the spindle apparatus. TPX2 was identified by mass spectrometry as a major protein coimmunoprecipitating specifically with Aurora-A from mitotic HeLa cell extracts. Conversely, Aurora-A could be detected in TPX2 immunoprecipitates. This indicates that subpopulations of these two proteins undergo complex formation in vivo. Binding studies demonstrated that the NH₂ terminus of TPX2 can directly interact with the

COOH-terminal catalytic domain of Aurora-A. Although kinase activity was not required for this interaction, TPX2 was readily phosphorylated by Aurora-A. Upon siRNA-mediated elimination of TPX2 from cells, the association of Aurora-A with the spindle microtubules was abolished, although its association with spindle poles was unaffected. Conversely, depletion of Aurora-A by siRNA had no detectable influence on the localization of TPX2. We propose that human TPX2 is required for targeting Aurora-A kinase to the spindle apparatus. In turn, Aurora-A might regulate the function of TPX2 during spindle assembly.

Introduction

One of the most critical steps during cell cycle progression is the correct segregation of sister chromatids during mitosis. This process depends on the reorganization of the interphase microtubules (MTs)* into a highly dynamic bipolar array known as the mitotic spindle. In animal cells, spindle assembly is initiated at the time when centrosomes separate and involves changes in the functional properties of several MT-associated proteins (Karsenti and Vernos, 2001; Wittmann et al., 2001). In many cases, these changes are brought about by reversible phosphorylation, and several protein kinases and phosphatases undergo at least transient association with either centrosomes or spindle MTs (Nigg, 2001). However, little is known about the mechanisms that underlie the recruitment of these enzymes to the spindle apparatus, let alone their exact function and regulation during spindle assembly.

Prominent among the kinases implicated in the regulation of spindle-associated events during early mitosis is Aurora-A, a member of the Aurora family of serine-threonine kinases (Bischoff and Plowman, 1999; Nigg, 2001). Studies in several

animal species concur to demonstrate that Aurora-A localizes to centrosomes and the spindle and that protein and activity levels peak at the G2/M transition (Bischoff and Plowman, 1999; Giet and Prigent, 1999). In *Drosophila*, the disruption of Aurora-A function causes centrosome disorganization and a reduction in the length of astral MTs (Glover et al., 1995; Giet et al., 2002). These phenotypes may relate to the ability of Aurora-A to interact with and phosphorylate D-TACC, a centrosome-associated protein implicated in the regulation of MT dynamics (Giet et al., 2002). Similarly, when Aurora-A (AIR-1) was eliminated by RNA-mediated interferences from *Caenorhabditis elegans* embryos, spindle assembly failed, and centrosome maturation, a process characterized by the recruitment of γ -tubulin and other components of the pericentriolar material, did not occur (Hannak et al., 2001). Biochemical studies performed in *Xenopus* egg extracts confirm an important role of Aurora-A in spindle assembly and/or maintenance (Roghi et al., 1998; Giet and Prigent, 2000). In particular, the kinesin-related motor protein Eg5 was identified as a candidate substrate of Aurora-A (Giet et al., 1999). In human cells, overexpression of Aurora-A was found to interfere with mitotic exit, causing tetraploidization and concomitant amplification of centrosomes (Meraldi et al., 2002). Furthermore, overexpression of Aurora-A resulted in neoplastic transformation of NIH-3T3 cells (Zhou et al., 1998). This is intriguing, since Aurora-A is frequently overexpressed in human tumors and the Aurora-A gene maps to a chromosomal locus

Address correspondence to Erich A. Nigg, Max Planck Institute of Biochemistry, Dept. of Cell Biology, Am Klopferspitz 18a, D-82152 Martinsried, Germany. Tel.: 49-89-8578-3100. Fax: 49-89-8578-3102. E-mail: nigg@biochem.mpg.de

*Abbreviations used in this paper: IVT, in vitro transcription/translation; KD, catalytically inactive; MT, microtubule; WT, wild-type.

Key words: spindle; mitosis; Aurora-A; TPX2; siRNA

(20q13.2–13.3) that is often amplified in colon, breast, and stomach cancers (Sen et al., 1997).

To better understand the role of Aurora-A in the regulation of spindle assembly and mitotic progression in human cells, we used a biochemical approach to search for proteins that specifically interact with Aurora-A. We report the identification of the human homologue of the spindle component TPX2 as a novel interactor and substrate of Aurora-A.

Results and discussion

Identification of a TPX2–Aurora-A complex in mitotic cells

To search for proteins interacting with Aurora-A, an antibody raised against a COOH-terminal peptide was used to immunoprecipitate Aurora-A from mitotic HeLa cell extracts. As shown by SDS-PAGE and Coomassie blue staining, the Aurora-A immunoprecipitate contained a protein of the expected size (45 kD) and additional proteins migrating at ~100 kD and >205 kD, respectively (Fig. 1 A, lane 2). None of these proteins were present when immunoprecipitations were performed with beads only (Fig. 1 A, lane 1) or in the presence of excess competing peptide (Fig. 1 A, lane 3). Mass spectrometry confirmed the identity of the 45 kD protein as Aurora-A (unpublished data). More importantly, it identified the 100-kD band as the human homologue of TPX2. By the use of a monoclonal antibody (Ki-S2), this protein had been shown previously to associate with the mitotic spindle (Heidebrecht et al., 1997). Furthermore, *Xenopus* TPX2 has been implicated in targeting the kinesin-related motor XKlp2 to the spindle (Wittmann et al., 1998) and has been shown to be essential for the formation of a robust bipolar spindle (Wittmann et al., 2000). Most recently, TPX2 was also identified as a critical component involved in promoting the RanGTP-regulated nucleation of MTs in the vicinity of chromosomes (Gruss et al., 2001).

To obtain information about the efficiency of complex formation between TPX2 and Aurora-A in mitotic cells, increasing amounts of Aurora-A immunoprecipitates were probed for the presence of TPX2 and vice versa (Fig. 1 B). The two proteins could readily be coimmunoprecipitated, regardless of whether anti-Aurora-A or anti-TPX2 antibodies were used for immunoprecipitation. No spurious precipitations were observed upon blocking the Aurora-A antibody with excess antigenic peptide or when using beads alone for control (Fig. 1 B, lanes 5). The comparison with the Western blot signals seen in total cell lysates (Fig. 1 B, lanes 1) indicates that, under the conditions used here, only a fraction (<5%) of TPX2 is recovered in a complex with Aurora-A and vice versa. What proportions of the two proteins associate in vivo is difficult to estimate, since the recovery of the complex is expected to depend on solubilization conditions. In any event, it appears likely that the in vivo formation of the TPX2–Aurora-A complex is regulated in a dynamic fashion.

TPX2–Aurora-A interaction is direct and independent of kinase activity

To determine whether the binding of TPX2 to Aurora-A depends on its kinase activity, GST-tagged constructs of wild-

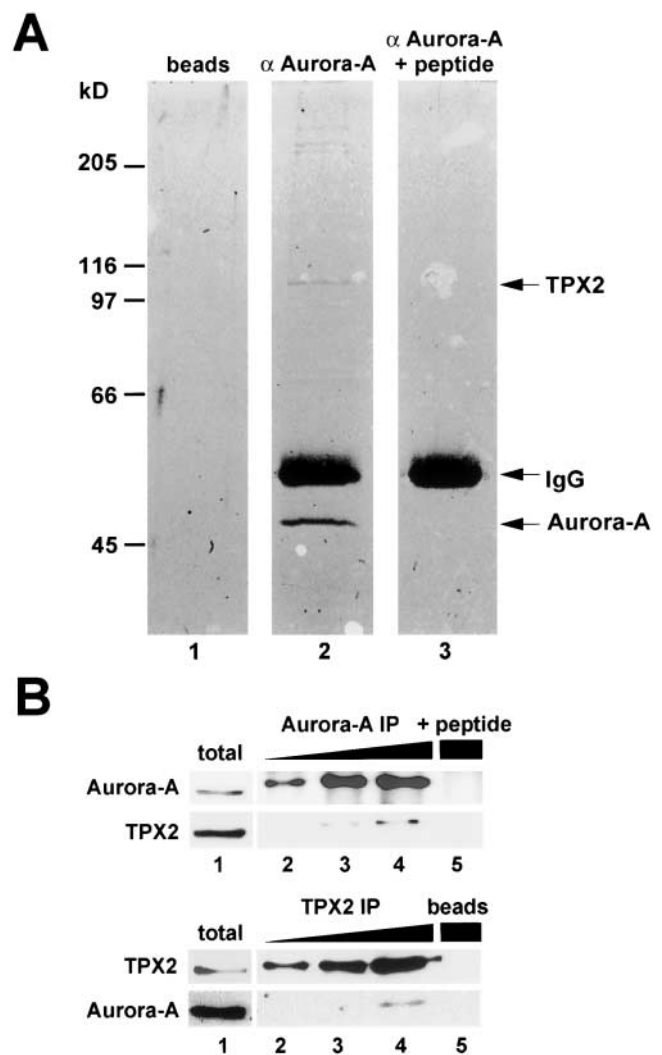


Figure 1. Identification of TPX2 as an Aurora-A-interacting protein. (A) Coomassie blue-stained gel of Aurora-A immunoprecipitate from mitotic HeLa cell extract (lane 2). For control, immunoprecipitations were also performed with either protein A-coated beads alone (lane 1) or Aurora-A antibody blocked with an excess of antigenic peptide (lane 3). Arrows point to the precipitated 45-kD Aurora-A protein, IgG heavy chain, and the 100-kD protein identified as TPX2 by tryptic peptide fingerprinting. The identity of the high molecular weight proteins coprecipitating with Aurora-A is currently under investigation. (B, top) Increasing amounts of Aurora-A immunoprecipitates (lanes 2–4) were separated by SDS-PAGE and analyzed by Western blotting using antibodies against Aurora-A and TPX2. The control immunoprecipitation was performed with the peptide blocked Aurora-A antibody (lane 5). (B, bottom) TPX2 coimmunoprecipitates were analyzed by Western blotting using antibodies against Aurora-A and TPX2. Beads alone were used for the control precipitation (lane 5). Total cell lysate was analyzed in parallel (lane 1).

type (WT) and catalytically inactive (KD) recombinant Aurora-A kinases were immobilized on glutathione Sepharose and incubated with extracts prepared from mitotic HeLa cells. Proteins bound to Aurora-A were then analyzed by SDS-PAGE and Western blotting (Fig. 2 A). Coomassie blue staining (Fig. 2 A, top) revealed a prominent band migrating at 100 kD as the major interaction partner of Aurora-A (Fig. 2 A, top, arrowheads). This protein was identified as TPX2 by both Western blotting (Fig. 2 A, bottom)

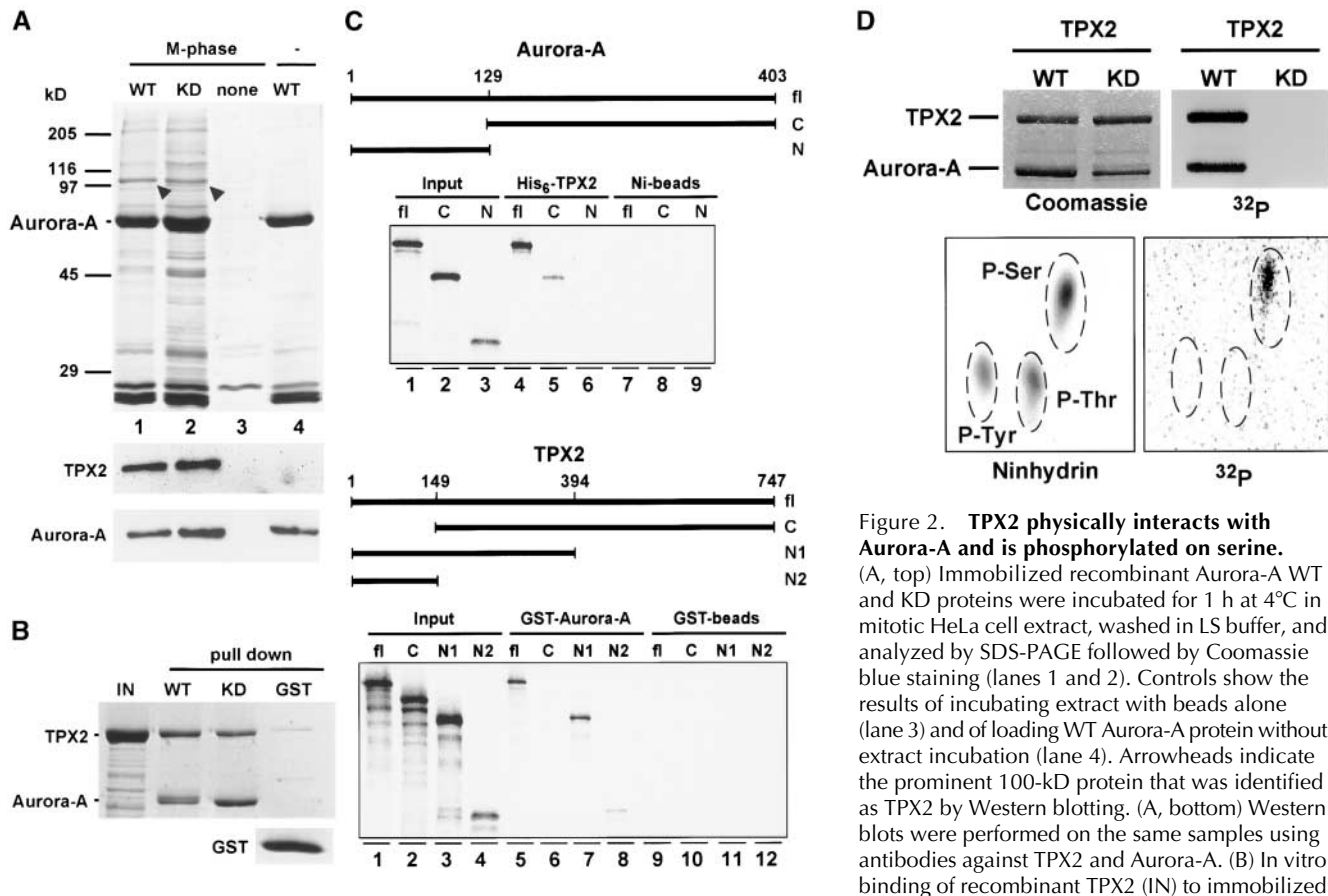


Figure 2. TPX2 physically interacts with Aurora-A and is phosphorylated on serine.

(A, top) Immobilized recombinant Aurora-A WT and KD proteins were incubated for 1 h at 4°C in mitotic HeLa cell extract, washed in LS buffer, and analyzed by SDS-PAGE followed by Coomassie blue staining (lanes 1 and 2). Controls show the results of incubating extract with beads alone (lane 3) and of loading WT Aurora-A protein without extract incubation (lane 4). Arrowheads indicate the prominent 100-kD protein that was identified as TPX2 by Western blotting. (A, bottom) Western blots were performed on the same samples using antibodies against TPX2 and Aurora-A. (B) In vitro binding of recombinant TPX2 (IN) to immobilized

GST-tagged Aurora-A WT and KD proteins, or GST for control. (C) Mapping the interaction domains on Aurora-A and TPX2. Fragments of Aurora-A and TPX2, as indicated schematically, were produced by IVT, and binding to His₆-TPX2 (top) or GST-Aurora-A (bottom) was assayed. Protein complexes were recovered on Ni-Sepharose beads and glutathione beads, respectively; Ni-Sepharose beads or GST-coated glutathione beads were used for control. Autoradiographs show corresponding amounts of input samples and proteins recovered in protein complexes. (D) In vitro kinase assay was performed with recombinant GST-tagged Aurora-A and recombinant human TPX2 in the presence of [γ -³²P]ATP. Both the Coomassie blue-stained gel (left) and the autoradiograph (right) are shown. (D, bottom) Phosphoamino acid analysis of ³²P-labeled TPX2 (right); ninhydrin staining (left) shows the migration of phosphoamino acid standards.

and mass spectrometry (not depicted). No TPX2 was seen in control experiments using glutathione beads alone (Fig. 2 A, bottom, lanes 3) or in the Aurora-A input (Fig. 2 A, bottom, lanes 4). Most importantly, the extent of binding of TPX2 to WT or KD Aurora-A was virtually identical (Fig. 2 A, compare lanes 1 and 2). Thus, WT and KD Aurora-A have a similar affinity for TPX2.

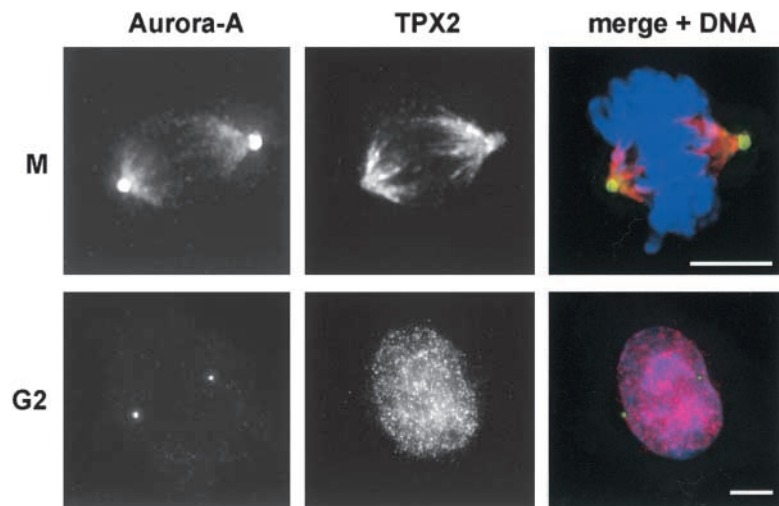
To establish whether the interaction between Aurora-A and TPX2 was direct or indirect, in vitro binding assays were performed using immobilized recombinant Aurora-A kinases and soluble, recombinant TPX2 tagged with the IgG binding domain of protein A. As shown in Fig. 2 B, TPX2 bound to WT or KD Aurora-A in near stoichiometric amounts, but virtually no TPX2 bound to GST-coated control beads. To map the interacting domains of the two proteins, binding studies were then performed with in vitro transcribed/translated fragments of Aurora-A and TPX2 (Fig. 2 C). The two full-length proteins bound to each other as expected, and no binding occurred to control beads. Binding to full-length TPX2 was also observed with the catalytic, COOH-terminal part of Aurora-A but not with the NH₂-terminal domain (Fig. 2 C, top). In a converse type of experiment (Fig. 2 C, bottom), the NH₂-terminal 394 amino acids of TPX2 (N1)

were able to bind full-length Aurora-A, and weak binding was also observed with the first 149 amino acids of TPX2 (N2). In contrast, no binding occurred with the COOH-terminal part (Fig. 2 C, C; residues 149–747). These data show that the catalytic domain of Aurora-A interacts directly with the NH₂-terminal domain of TPX2.

TPX2 is a substrate of Aurora-A

To investigate whether TPX2 is a substrate of Aurora-A, in vitro kinase assays were performed. Upon incubation of recombinant, protein A-tagged TPX2 with Aurora-A in the presence of [γ -³²P]ATP, TPX2 was readily phosphorylated by WT Aurora-A but not the KD mutant (Fig. 2 D). No incorporation of ³²P into the protein A tag was observed (not depicted). As determined by phosphoamino acid analysis, phosphorylation of TPX2 occurred on serine residues (Fig. 2 D). Human TPX2 has been reported previously to be phosphorylated in intact cells (Heidebrecht et al., 1997), and similarly, *Xenopus* TPX2 was shown to be phosphorylated specifically in M phase extracts (Wittmann et al., 2000). Although the kinase(s) responsible for these phosphorylations have not been identified previously, our present data identify Aurora-A as a likely regulator of TPX2. At present, we can only spec-

Figure 3. TPX2 and Aurora-A colocalize on the spindle. Indirect immunofluorescence micrographs of HeLa S3 cells stained for Aurora-A (left) and TPX2 (middle). A merge of the two images together with DAPI staining of DNA is shown in the right panel. The top row shows a representative metaphase cell; the bottom row shows a representative G2 phase cell. Bars, 10 μ m.



ulate on the physiological significance of TPX2 phosphorylation, but it is attractive to postulate that this modification could regulate the interaction of TPX2 with other spindle-associated proteins. In future studies, it will be important to map the phosphorylation sites within TPX2 and analyze the phosphorylation state of each site through the cell cycle.

TPX2 and Aurora-A partially colocalize in vivo

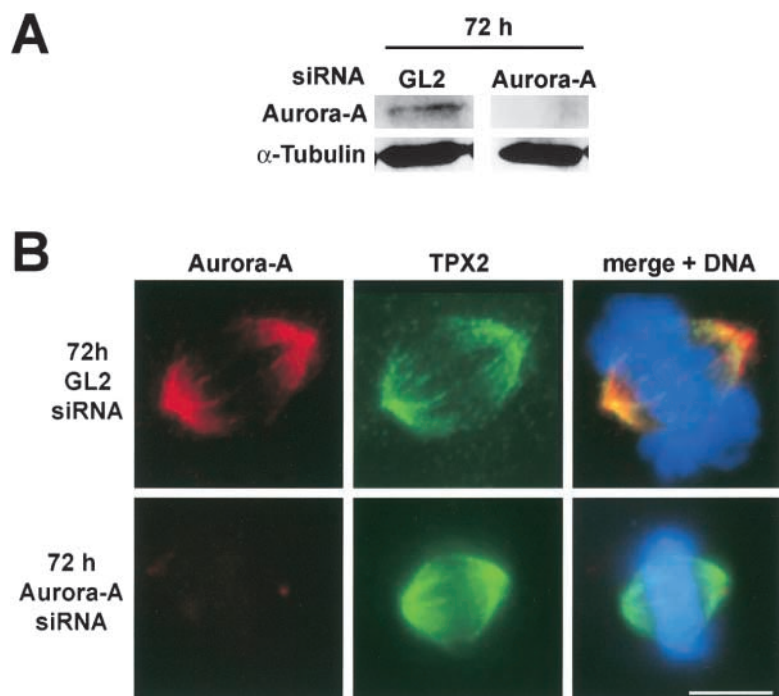
In previous studies, both TPX2 and Aurora-A have been localized independently to the spindle apparatus (Glover et al., 1995; Heidebrecht et al., 1997; Bischoff et al., 1998; Roghi et al., 1998; Schumacher et al., 1998; Wittmann et al., 2000). To compare the subcellular localization of these two proteins more directly, double indirect immunofluorescence microscopy was performed on HeLa and U2OS cells. In both cell types, a substantial colocalization of Aurora-A and TPX2 could be seen on the spindle apparatus. In contrast,

spindle poles were strongly positive for Aurora-A but only weakly stained by anti-TPX2 antibodies (Fig. 3, top row). Similarly, centrosomes in G2 cells were positive for Aurora-A but not for TPX2 (Fig. 3, bottom row). Thus, although both TPX2 and Aurora-A localize to spindle MTs, only Aurora-A is prominent at centrosomes and spindle poles.

TPX2 is required for recruiting Aurora-A to spindle MTs

To explore the functional significance of the interaction between Aurora-A and TPX2 in HeLa cells, the two corresponding genes were silenced by siRNA (Elbashir et al., 2001). A 72-h treatment with a duplex oligonucleotide specific for Aurora-A resulted in a substantial, albeit not complete, depletion of the kinase (Fig. 4, A and B). As a result, a significant increase in apoptotic events could be seen (not depicted). The remaining Aurora-A-depleted cells did not arrest in the cell cycle and bipolar spindles did form, al-

Figure 4. TPX2 localization is independent of Aurora-A. (A) Western blot analysis of total extracts from HeLa cells treated for 72 h with a siRNA duplex targeting Aurora-A or a control duplex (GL2). Filters were probed for Aurora-A and α -tubulin as a loading control. (B) HeLa S3 cells were treated for 72 h with an Aurora-A-specific siRNA duplex (top row) or a control duplex (GL2; bottom row) and then fixed and stained with antibodies against Aurora-A (left) and TPX2 (middle). A merge of the two images together with DAPI staining of DNA is shown on the right. Bar, 10 μ m.



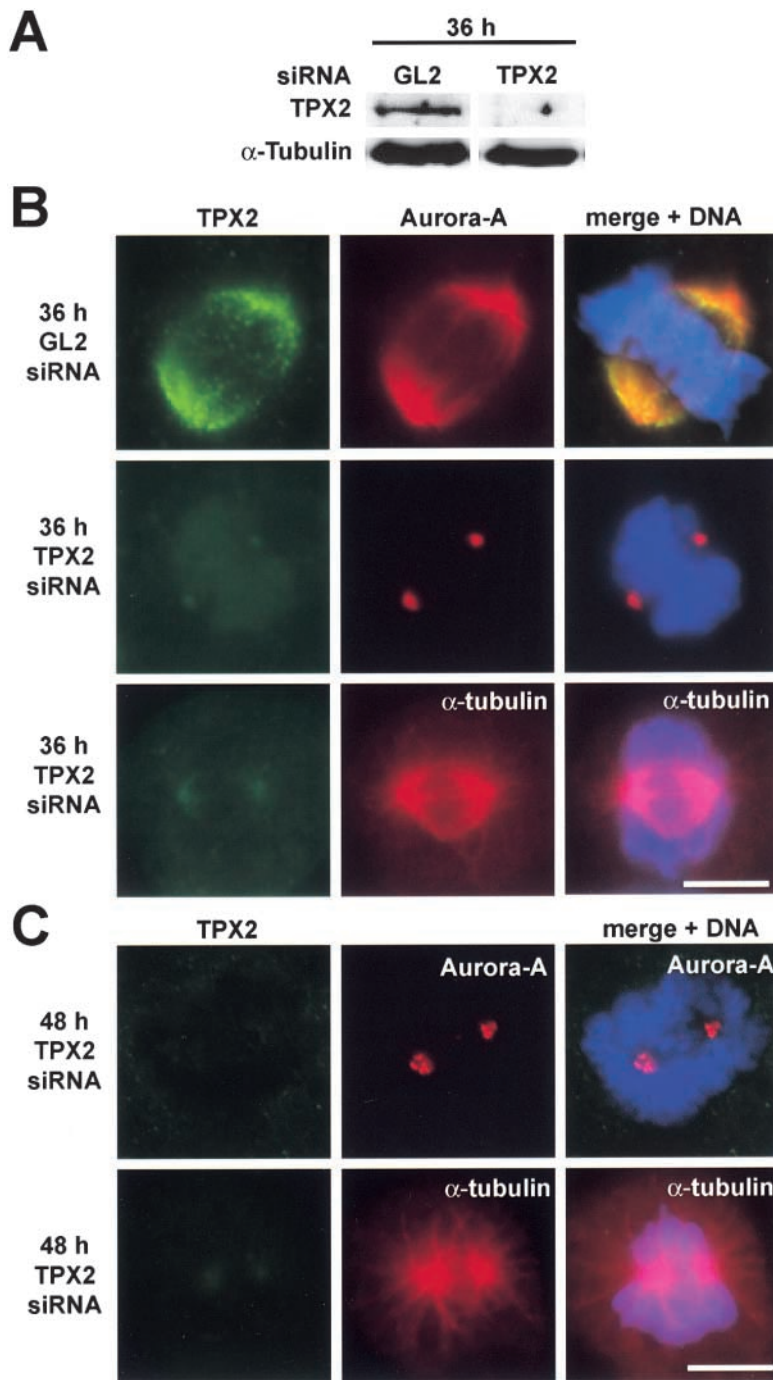


Figure 5. TPX2 localizes Aurora-A to the spindle.

(A) Western blot analysis of total extracts from HeLa cells treated for 36 h with a TPX2-specific siRNA duplex or a control duplex (GL2). Filters were probed for Aurora-A and α -tubulin as a loading control. (B and C) HeLa S3 cells were treated for 36 (A) or 48 h (B) with TPX2-specific siRNA duplex or a control duplex (GL2) and then fixed and stained with the antibodies indicated. Right panels show merged images, including DNA staining by DAPI. Bars, 10 μ m.

though tubulin staining revealed that the poles were often broader than usual (not depicted). Of particular interest in the present context, depletion of the bulk of Aurora-A did not detectably interfere with the localization of TPX2 to spindle MTs (Fig. 4 B).

With the duplexes chosen here, the elimination of TPX2 by siRNA was more efficient than that of Aurora-A. The bulk of TPX2 had disappeared already after 36 h (Fig. 5, A and B), and by 48 h, the protein was almost undetectable (Fig. 5 C). Staining of MTs in TPX2-depleted cells showed that spindle formation was progressively impaired, and beginning at \sim 16 h after TPX2 siRNA treatment, many cells rounded up and arrested in a prometaphase-like stage (unpublished data). Most interestingly, the localization of Au-

rorA was profoundly altered in TPX2-depleted cells. By 36 h of TPX2 depletion, Aurora-A was completely absent from MTs, although it could readily be detected at spindle poles (Fig. 5 B, middle row). This result could not be attributed to an absence of MTs, since these could readily be visualized by staining with anti- α -tubulin antibodies (Fig. 5 B, bottom row). By 48 h, spindle poles displayed increasing fragmentation, and again these fragmented poles stained positively for Aurora-A (Fig. 5 C). MT arrays were still present in these cells, but they were highly abnormal and, as observed already at the 36 h time point, devoid of Aurora-A (Fig. 5 C). Together, these results clearly indicate that TPX2 is specifically required for the association of Aurora-A with spindle MTs but not for its localization to spin-

dle poles. Conversely, the spindle association of TPX2 does not depend on the presence of Aurora-A.

In conclusion, we describe the identification of the spindle-associated MT-binding protein TPX2 as a novel interacting partner and candidate substrate of Aurora-A. In particular, we show that the association of Aurora-A with spindle MTs requires TPX2 but not vice versa. Also, Aurora-A is able to localize to spindle poles without TPX2. These findings indicate that TPX2 mediates specifically the dynamic interaction between Aurora-A and spindle MTs. Conversely, they raise the possibility that TPX2 function is regulated by Aurora-A kinase.

Materials and methods

Production of recombinant proteins and antibodies

Aurora-A WT and K162R cDNAs (Meraldi et al., 2002) were GST tagged and subcloned into pVL13GST93 (Amersham Biosciences). Recombinant baculoviruses were produced using the BaculoGold kit according to the manufacturer (BD Pharmingen). Sf9 cells were lysed in lysis buffer (LB; 10 mM Hepes, pH 7.7, 150 mM NaCl, 5 mM EGTA, 1% NP-40) containing phosphatase and protease inhibitors as described (Stucke et al., 2002). GST-Aurora-A was subsequently isolated using glutathione-Sepharose™ 4B beads (Amersham Biosciences) and washed with LB containing 300 mM NaCl and then with kinase buffer (20 mM Hepes, pH 7.4, 150 mM KCl, 5 mM MnCl₂, 5 mM NaF, 1 mM DTT).

A rabbit antibody against human Aurora-A was raised using a COOH-terminal peptide (CQNKESASKQS) of human Aurora-A coupled to keyhole limpet hemocyanin as antigen. Antibodies were immunopurified on the antigenic peptide covalently bound to activated thiopropyl Sepharose™ (Amersham Biosciences). For expression of recombinant human TPX2, an NH₂-terminal protein A binding domain (zz domain) was fused to the TPX2 cDNA followed by a histidine tag from the pQE 60 (QIAGEN) vector. TPX2 protein was expressed in *Escherichia coli* and purified as described before (Gruss et al., 2001). A rabbit antibody against TPX2 was raised using the recombinant full-length human TPX2 protein. Polyclonal sera were affinity purified on the antigen covalently linked to AffiGel 10 (Biometra).

Cell lysates, immunoprecipitations, and immunoblotting

Cell extracts from nocodazole (100 ng/ml) arrested mitotic HeLa S3 cells were prepared as described previously (Stucke et al., 2002). For immunoprecipitations, cell extracts were incubated for 1 h with Aurora-A antibody followed by a 3-h incubation with Affi-Prep® Protein A beads (Bio-Rad Laboratories). Beads were subsequently washed three times in LS buffer (50 mM Tris, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1% NP-40) and boiled in SDS-PAGE sample buffer. As a negative control, the antibody was incubated for 30 min with a 100× molar excess of the antigenic peptide before the incubation. To precipitate TPX2 complexes, the monoclonal antibody mAb Ki-S2 (Heidebrecht et al., 1997) was bound to Protein G Sepharose™ 4 fast flow (Amersham Biosciences), incubated for 3 h in the cell extracts, washed in LS buffer, and boiled in gel sample buffer. For Western blotting, Ki-S2 (1:5) or the purified Aurora-A antibody (32 µg/ml) were used and detected by ECL SuperSignal® (Pierce Chemical Co.).

siRNA

For siRNA, the following target sequences were used: Aurora-A, ₇₂₅AUG CCC UGU CUU ACU GUC A₇₄₃; TPX2, ₁₄₄GAA UGG AAC UGG AGG GCU₁₆₁. Oligonucleotides (Dharmacon Research, Inc.) were annealed and transfected using oligofectamine (Life Technologies) as described (Elbashir et al., 2001). As a control, the GL-2 duplex, targeting the luciferase gene, was used (Elbashir et al., 2001).

Immunofluorescence microscopy

Immunofluorescence microscopy was performed on HeLa S3 cells grown on coverslips fixed for 6 min in −20°C methanol. Sequential incubation of primary and secondary antibodies was done in PBS containing 3% BSA. Immunofluorescence microscopy, image acquisition, and processing was performed as described previously (Stucke et al., 2002). Antibodies used are as follows: purified rabbit α-Aurora-A (32 µg/ml), Ki-S2 (1:2) (Heidebrecht et al., 1997), rabbit α-TPX2 (20 µg/ml), mouse mAb α-tubulin (1:3,000) (Sigma-Aldrich), Texas red-conjugated goat α-mouse IgG (1:1,000) (Sigma-

Aldrich), and Alexa488-conjugated goat α-rabbit IgG (1:1,000) (Molecular Probes). DNA was stained with DAPI (Sigma-Aldrich) (2 µg/ml).

In vitro protein binding and kinase assays

In vitro binding assays were performed by incubating recombinant GST-tagged Aurora-A bound to glutathione-Sepharose with soluble recombinant TPX2 for 1 h at 30°C in kinase buffer containing 10 µM ATP. Subsequently, the beads were washed three times in LS buffer, and proteins were analyzed by SDS-PAGE followed by Coomassie blue staining. For in vitro kinase assays, recombinant Aurora-A WT and KD bound to glutathione-Sepharose were incubated with recombinant TPX2 in kinase buffer including 0.1 µCi [γ-³²P]ATP and 10 µM ATP for 30 min at 30°C before reactions were stopped by the addition of SDS-PAGE sample buffer. Autoradiographs were made using a PhosphorImager (Fuji-Film).

Phosphoamino acid analysis of in vitro-phosphorylated TPX2 protein was performed by acid hydrolysis and thin layer chromatography as described (Boyle et al., 1991). Fragments of TPX2 and Aurora-A gene were generated by PCR and subcloned into the pcDNA3.1(−)myc3 (Invitrogen) vector. In vitro transcription/translation (IVT) was performed in the presence of ³⁵S methionine using TnT®-coupled reticulocyte lysate (Promega) and T7 RNA polymerase (Promega). IVT products were diluted three times in PBS and incubated for 3 h at 4°C with an excess of recombinant TPX2 bound to Ni-Sepharose (QIAGEN) or GST-Aurora-A bound to glutathione beads. Beads were washed four times with LS buffer and analyzed by SDS-PAGE followed by autoradiography.

Mass spectrometry

Proteins were in-gel-digested with sequencing-grade porcine trypsin (Promega) essentially as described (Shevchenko et al., 1996). Peptide mass fingerprinting was performed on the extracted peptides using a MALDI-TOF instrument (Reflex III; Bruker) and probability-based database searching (Perkins et al., 1999).

We thank H.J. Heidebrecht (University of Kiel, Germany) for a kind gift of Ki-S2 antibody and K. Weber and J. Harborth (Max Planck Institute for Biophysical Chemistry, Göttingen, Germany) for help with siRNA. We are also grateful to I. Vernos (European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, Germany) for helpful discussions and to all members of the Nigg laboratory for advice.

Submitted: 29 April 2002

Revised: 3 July 2002

Accepted: 8 July 2002

References

- Bischoff, J., and G.D. Plowman. 1999. The Aurora/Ipl1p kinase family: regulators of chromosome segregation and cytokinesis. *Trends Cell Biol.* 9:454–459.
- Bischoff, J.R., L. Anderson, Y. Zhu, K. Mossie, L. Ng, B. Souza, B. Schryver, P. Flanagan, F. Clairvoyant, C. Ginther, et al. 1998. A homologue of *Drosophila* aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *EMBO J.* 17:3052–3065.
- Boyle, W.J., G.P. van der Geer, and T. Hunter. 1991. Phosphopeptide mapping and phosphoamino acid analysis by two-dimensional separation on thin-layer cellulose plates. *Methods Enzymol.* 201:110–149.
- Elbashir, S., J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, and T. Tuschl. 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature.* 411:494–498.
- Giet, R., and C. Prigent. 1999. Aurora/Ipl1p-related kinases, a new oncogenic family of mitotic serine-threonine kinases. *J. Cell Sci.* 112:3591–3601.
- Giet, R., and C. Prigent. 2000. The *Xenopus laevis* aurora/Ipl1p-related kinase pEg2 participates in the stability of the bipolar mitotic spindle. *Exp. Cell Res.* 258:145–151.
- Giet, R., R. Uzbekov, F. Cubizolles, K. Le Guellec, and C. Prigent. 1999. The *Xenopus laevis* aurora-related protein kinase pEg2 associates with and phosphorylates the kinesin-related protein XIEg5. *J. Biol. Chem.* 274:15005–15013.
- Giet, R., D. McLean, S. Descamps, M.J. Lee, J.W. Raff, C. Prigent, and D.M. Glover. 2002. *Drosophila* Aurora A kinase is required to localize D-TACC to centrosomes and to regulate astral microtubules. *J. Cell Biol.* 156:437–451.
- Glover, D., M.H. Leibowitz, D.A. McLean, and H. Parry. 1995. Mutations in aurora prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles. *Cell.* 81:95–105.
- Gruss, O., R.E. Carazo-Salas, C.A. Schatz, G. Guarguaglini, J. Kast, M. Wilm, N. Le Bot, I. Vernos, E. Karsenti, and I.W. Mattaj. 2001. Ran induces spindle

- assembly by reversing the inhibitory effect of importin alpha on TPX2 activity. *Cell*. 104:83–93.
- Hannak, E., M. Kirkham, A.A. Hyman, and K. Oegema. 2001. Aurora-A kinase is required for centrosome maturation in *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Biol.* 155:1109–1116.
- Heidebrecht, H., F. Buck, J. Steinmann, R. Sprenger, H.H. Wacker, and R. Parwaresch. 1997. p100: a novel proliferation-associated nuclear protein specifically restricted to cell cycle phases S, G2, and M. *Blood*. 90:226–233.
- Karsenti, E., and I. Vernos. 2001. The mitotic spindle: a self-made machine. *Science*. 294:543–547.
- Meraldi, P., R. Honda, and E.A. Nigg. 2002. Aurora-A overexpression reveals tetraploidization as a major route to centrosome amplification in p53(–/–) cells. *EMBO J.* 21:483–492.
- Nigg, E. 2001. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2:21–32.
- Perkins, D., D.J. Pappin, D.M. Creasy, and J.S. Cottrell. 1999. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*. 20:3551–3567.
- Roghi, C., R. Giet, R. Uzbekov, N. Morin, I. Chartrain, R. Le Guellec, A. Couturier, M. Doree, M. Philippe, and C. Prigent. 1998. The *Xenopus* protein kinase pEg2 associates with the centrosome in a cell cycle-dependent manner, binds to the spindle microtubules and is involved in bipolar mitotic spindle assembly. *J. Cell Sci.* 111:557–572.
- Schumacher, J., N. Ashcroft, P.J. Donovan, and A. Golden. 1998. A highly conserved centrosomal kinase, AIR-1, is required for accurate cell cycle progression and segregation of developmental factors in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Development*. 125:4391–4402.
- Sen, S., H. Zhou, and R.A. White. 1997. A putative serine/threonine kinase encoding gene BTAK on chromosome 20q13 is amplified and overexpressed in human breast cancer cell lines. *Oncogene*. 14:2195–2200.
- Shevchenko, A., M. Wilm, O. Vorm, and M. Mann. 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 68:850–858.
- Stucke, V., H.H.W. Sillje, L. Arnaud, and E.A. Nigg. 2002. Human Mps1 kinase is required for the spindle assembly checkpoint but not for centrosome duplication. *EMBO J.* 21:1723–1732.
- Wittmann, T., A. Hyman, and A. Desai. 2001. The spindle: a dynamic assembly of microtubules and motors. *Nat. Cell Biol.* 3:E28–E34.
- Wittmann, T., M. Wilm, E. Karsenti, and I. Vernos. 2000. TPX2, a novel *Xenopus* MAP involved in spindle pole organization. *J. Cell Biol.* 149:1405–1418.
- Wittmann, T., H. Boleti, C. Antony, E. Karsenti, and I. Vernos. 1998. Localization of the kinesin-like protein Xklp2 to spindle poles requires a leucine zipper, a microtubule-associated protein, and dynein. *J. Cell Biol.* 143:673–685.
- Zhou, H., J. Kuang, L. Zhong, W.L. Kuo, J.W. Gray, A. Sahin, B.R. Brinkley, and S. Sen. 1998. Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. *Nat. Genet.* 20:189–193.